

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-75856

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月23日

(51) Int.Cl.⁶
C 1 2 N 15/09
C 0 7 K 14/47
C 1 2 N 9/90

識別記号
Z N A

F I
C 1 2 N 15/00
C 0 7 K 14/47
C 1 2 N 9/90
Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願平9-251544

(22) 出願日 平成9年(1997) 9月17日

(71) 出願人 596149475

鶴尾 隆

東京都世田谷区宮坂3-36-6

(71) 出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

(72) 発明者 鶴尾 隆

東京都世田谷区宮坂3-36-6

(72) 発明者 山根 和彦

東京都豊島区巣鴨1-26-12 宮館コーポ
203号

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 トポイソメラーゼ結合タンパク質

(57) 【要約】

【解決手段】 トポイソメラーゼIIに結合するタンパク質、そのタンパク質をコードする遺伝子、およびこのタンパク質とトポイソメラーゼIIとの結合を阻害する物質のスクリーニング方法を提供する。

【効果】 本発明の方法によれば、トポイソメラーゼII α および β の双方に結合する新規タンパク質であるTopBP1とTopBP2の遺伝子および遺伝子産物を得ることができる。また、TopBPとトポイソメラーゼIIとの結合を阻害する物質のスクリーニング方法が提供される。さらに、トポイソメラーゼ-TopBP複合体におけるトポイソメラーゼ活性阻害物質のスクリーニング方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項2】 以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項3】 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項4】 請求項3に記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項5】 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項6】 請求項5に記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項7】 配列番号3に記載のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項8】 トポイソメラーゼIIと前記トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する請求項3～7に記載のタンパク質とを、検体の存在下に反応させる工程と、前記トポイソメラーゼIIと前記トポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質との複合体の生成量を測定する工程とを備える、TopBPタンパク質とトポイソメラーゼIIの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法。

【請求項9】 トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する請求項3～7に記載のタンパク質と特異的な吸収スペクトルを有する化合物もしくは特異的な検出が可能な化合物とを、反応させる複合体形成工程と、タンパク質結合活性を有する担体を用いて前記複合体を濾過し、前記複合体と未結合の化合物とを分離する分離工程と、濾液中に存在する未結合の化合物を検出する検出工程とを備える、TopBPタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法。

【請求項10】 トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する請求項3～7に記載のタンパク質とトポイソメ

ラーゼIIと反応させる第一複合体形成工程と、前記第一複合体と特異的な吸収スペクトルを有する化合物もしくは特異的な検出が可能な化合物とを反応させる第二複合体形成工程と、タンパク質結合活性を有する担体を用いて前記第二複合体を濾過し、前記複合体と未結合の化合物とを分離する分離工程と、濾液中に存在する未結合の化合物を検出する検出工程とを備える、トポイソメラーゼII-TopBPタンパク質複合体に結合する化合物のスクリーニング方法。

【請求項11】 TopBPタンパク質とトポイソメラーゼIIと反応させる第一複合体形成工程と、前記第一複合体と化合物とを反応させる第二複合体形成工程と、前記第二複合体形成時におけるトポイソメラーゼIIの活性を検出する活性検出工程とを備える、トポイソメラーゼII-TopBPタンパク質複合体におけるトポイソメラーゼII活性を阻害する化合物のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、トポイソメラーゼ結合タンパク質(TopBP)に関する。より詳細には、ヒトトポイソメラーゼII結合タンパク質として新たに見出されたTopBP1およびTopBP2に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】DNAのトポロジカルな変化を触媒する酵素であるトポイソメラーゼには、トポイソメラーゼIとトポイソメラーゼIIとがあることが知られている。これらのうち、トポイソメラーゼIIには、異なる遺伝子から発現される、トポイソメラーゼII α およびトポイソメラーゼII β という2種類のタイプがあることが知られている。ヒトの遺伝子から発現された場合のこれらの分子量は、トポイソメラーゼII α が170kDa、トポイソメラーゼII β が180kDaである。N-末端で始まる、トポイソメラーゼII β セグメントの4分の3はトポイソメラーゼII α との相同性が高かったが、C-末端領域が異なり、この領域によって異なる細胞の機能、すなわち活性調節機構が存在することが示唆されている。

【0003】DNAトポイソメラーゼは、DNAのトポロジカルな変化を触媒する酵素であり、トポイソメラーゼIIは、DNA中における二本鎖の一時的な切断を生じさせ、そのままの(intact)DNAをこの切断部を通して移動させ、この切断部をライゲートするように作用する。そして、トポイソメラーゼIIは酵母における染色体の分離と複製とに必須であることが知られている(Watt, P.M., and Hickman, J.D., Biochem. J. 303:681-695(1994), およびWang, J.C., Annu. Rev. Biochem. 65:635-692(1996))。

【0004】このような作用を有するトポイソメラーゼは抗腫瘍剤との関連が深く、アドリアマイシンおよびエトポシドなどの主要な抗腫瘍剤は、DNAのニック部位に

共有結合されたトポイソメラーゼの中間反応を安定化することが知られている(Liu, L. F. Annu. Rev. Biochem. 58:351-375(1989))。

【0005】このような開裂可能な複合体によって生じるDNAの損傷によって、プログラムされた腫瘍細胞の死を導くことができることは、Kaufman, S. H. (Kaufman, S. H., Cancer Res., 49:5870-5878(1989))によったアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質であることを特徴とする。

【0006】また、低酸素およびグルコース欠乏症などのストレス条件の下で自然に発生する固形腫瘍ではトポイソメラーゼIIの量が少ないことも知られており、このことにより、化学療法に対する固形腫瘍の耐性が、部分的には、トポイソメラーゼIIの量の減少によるものであることが示唆されている(Beck, W. T.とDanks, M. K. Oncol. Res. 2:235-244(1991), Yun, J., Tomida, Nagata K.とTsuruo, T. Oncol. Res. 7:583-590(1991))。

【0007】したがって、理論的には何らかの手段を用いてトポイソメラーゼIIの活性を調節することにより、腫瘍に対する化学療法の効果を高めることも可能である。しかし、トポイソメラーゼの活性を何らかの手段で調節するためには、トポイソメラーゼの活性の調節機構を解明し、このような調節機構に包含される因子を同定することが必要である。

【0008】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明の発明者らは、このような状況の下で、トポイソメラーゼの活性調節機構の解明を目的として鋭意研究を進めた結果、この調節機構に包含される因子であり、トポイソメラーゼIIβのC-末端領域に結合する新規なタンパク質を見出し、本発明を完成したものである。

【0009】すなわち、本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子であり、ここで(a)および(b)はそれぞれ、(a)配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質、である。

【0010】また、本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子であり、ここで、(a)および(b)はそれぞれ、(a)配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)アミノ酸配列(a)において1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質、である。

【0011】さらに、本発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質である。ここで、本発明のタンパク質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラー

ゼIIに結合する活性を有するタンパク質であることを特徴とする。

【0012】さらにまた、本発明は、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質である。ここで、本発明は、配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加される。

【0013】本発明はまた、配列番号3に記載のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質である。

【0014】上記のアミノ酸の付加、欠失又は置換は出願前周知技術である部位特定変異誘発(例えば、Nucleic Acids Research, Vol.10 No.20, p6487~6500を参照のこと)により実施することができ、アミノ酸の付加、欠失又は置換に関し、1又は数個のアミノ酸とは、部位特定変異誘発法により付加、欠失又は置換できる程度のアミノ酸である。

【0015】さらに、本発明は、トポイソメラーゼIIと前記トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する配列番号1~3に記載のタンパク質またはこれらの配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、付加されたタンパク質(以下、変異タンパク質という)とを、検体の存在下に反応させる工程と、前記トポイソメラーゼIIと前記トポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質との複合体の生成量を測定する工程とを備える、TopBPタンパク質とトポイソメラーゼIIの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法である。

【0016】本発明は、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する上記のタンパク質または変異タンパク質と特異的な吸収スペクトルを有する化合物もしくは特異的な検出が可能な化合物とを、反応させる複合体形成工程と、タンパク質結合活性を有する担体を用いて前記複合体を濾過し、前記複合体と未結合の化合物とを分離する分離工程と、濾液中に存在する未結合の化合物を検出する検出工程とを備える、TopBPタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法である。

【0017】本発明はまた、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する上記のタンパク質または変異タンパク質とトポイソメラーゼIIと反応させる第一複合体形成工程と、前記第一複合体と特異的な吸収スペクトルを有する化合物もしくは特異的な検出が可能な化合物とを反応させる第二複合体形成工程と、タンパク質結合活性を有する担体を用いて前記第二複合体を濾過し、前記複合体と未結合の化合物とを分離する分離工程と、濾液中に存在する未結合の化合物を検出する検出工程とを備える、トポイソメラーゼII-TopBPタンパク質複合体に結合す

る化合物のスクリーニング方法である。

【0018】加えて、本発明は、TopBPタンパク質とトポイソメラーゼIIと反応させる第一複合体形成工程と、前記第一複合体と化合物とを反応させる第二複合体形成工程と、前記第二複合体形成時におけるトポイソメラーゼIIの活性を検出する活性検出工程とを備える、トポイソメラーゼII-TopBPタンパク質複合体におけるトポイソメラーゼII活性を阻害する化合物のスクリーニング方法である。

【0019】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳細に説明する。「(a)配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子」とは、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であればよく、種々の動物に由来するもの、化学合成されたもの、および遺伝子工学的に産生されたタンパク質をコードする遺伝子を包含する。

【0020】「アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列をコードする遺伝子」とは、上記の配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1個以上、特に1もしくは数個のアミノ酸が欠失したもの、あるアミノ酸が他のアミノ酸と置換されたもの、もしくは上記のアミノ酸配列にアミノ酸が付加されたものをコードする遺伝子をいう。ここで、アミノ酸配列の欠失は、欠失が生じたタンパク質がトポイソメラーゼIIに結合する活性を有する限り、配列番号1のアミノ酸配列のいかなる部分に生じていてもよく、その数も限定されない。アミノ酸が置換された場合および付加された場合にも、置換もしくは付加が生じた後のタンパク質がトポイソメラーゼIIに結合する活性を有する限り、アミノ酸の置換、付加の数およびそれらが生じる位置は特に限定されない。

【0021】本発明において、TopBPとは「トポイソメラーゼに結合する活性を有するタンパク質」をいう。TopBPには、後述するように、TopBP1とTopBP2とが含まれる。「トポイソメラーゼに結合する活性」とは、トポイソメラーゼと何らかの相互作用が可能な形で結合する活性を意味し、例えば、水素結合などによって結合することができる活性をいう。

【0022】「トポイソメラーゼ」とは、DNAのトポロジカルな変化を触媒する酵素をいい、その由来は特に限定されない。すなわち、ヒトを始めとする哺乳類などの動物種を酵素源として得られたものであってもよく、トポイソメラーゼをコードする遺伝子を用いて、細胞によって遺伝子工学的に産生させたものであってもよい。

【0023】トポイソメラーゼが触媒する反応には、超らせんの変化および結び目や連鎖構造の形成が含まれ、DNAをトポロジカルに変換するためにはDNA鎖の一時的な切断と再結合が必要であるため、I型およびII型のトポイソメラーゼによってこのようなDNAの変化が触媒さ

れる。

【0024】本発明においてトポイソメラーゼIIとは、上記のトポイソメラーゼの2つの型のうち、II型のものをいう。トポイソメラーゼIIは二本鎖中の一本鎖に一時的に切断部を形成する。トポイソメラーゼIIは、DNA中における二本鎖を一時的に切断し、そのままの(intact) DNAをこの切断部を通して移動させ、この切断部をライゲートする。トポイソメラーゼIIをコードする遺伝子は、ヒトにおいては複数であり、異なる遺伝子から、トポイソメラーゼII α (170kDa)とトポイソメラーゼII β (180kDa)という2つのII型酵素が産生される。本発明においてTopBP1およびTopBP2が結合するタンパク質は、トポイソメラーゼIIである。

【0025】「トポイソメラーゼIIのC-末端領域」とは、トポイソメラーゼIIの3'側に存在する調節活性を有する領域を含む領域をいう。ヒトのトポイソメラーゼII β では、アミノ酸番号1143~1621で示される領域(配列番号6)をいい、ヒトのトポイソメラーゼII α ではアミノ酸配列番号1195~1531で示される領域をいう。

【0026】また、「(a)配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子」とは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であればよく、上記同様、種々の動物に由来するもの、化学合成されたもの、および遺伝子工学的に産生されタンパク質をコードする遺伝子を包含する。

【0027】「(b)アミノ酸配列(a)において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子」とは、配列番号1と同様なアミノ酸の欠失、置換、付加などの変異が生じており、さらにトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をいう。このような変異は、アミノ酸配列に変異が生じたタンパク質がトポイソメラーゼIIに結合できる活性を有する限り、配列番号2のアミノ酸配列のいかなる部分に生じていてもよく、その数も特に限定されない。

【0028】さらに、本発明は、配列番号1~3のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質である。ここで、本発明のタンパク質は、上記配列番号1~3のいずれかに記載のアミノ酸配列において、上述のような1もしくは数個のアミノ酸の欠失、置換もしくは付加が生じていてもよい。好ましくは、上記配列番号1~3のいずれかに記載のタンパク質をコードする遺伝子である。図1に、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるTopBPを模式的に示す。図1にはさらに、AにヒトのトポイソメラーゼII β の構造を、BにヒトのTopBP1の構造を示してある。CにTopBP2の構造を示す。

【0029】トポイソメラーゼは、図1Aに示すように、5'側から、ATPase活性、DNA切断/再結合活性、調

節活性をそれぞれ有する領域からなる。これらの領域のうち、DNA切断/再結合活性を有する部分の3'末端側から調節活性を有する部分にかけての領域、すなわち、トポイソメラーゼII β のアミノ酸番号1143~1621に該当する領域(配列番号6)がTopBP1および2の結合活性を有する。また、アミノ酸番号1,143~1,272に該当する領域(配列番号7)はTopBP2結合活性を有する領域である。なお、トポイソメラーゼII α のアミノ酸配列1,115~1,249もTopBP1およびTopBP2との結合活性を有する領域である。

【0030】TopBP1は1,522アミノ酸からなる分子量170,670のタンパク質であり、アデノシルリボシル化活性および核局在化活性を有する領域と、8つの繰り返し領域を有する。図1Bにおいて、これら繰り返し領域を1~8の数字で示した。アデノシルリボシル化活性を有する領域の上流側、すなわちアミノ酸番号862~1521までに該当する領域がトポイソメラーゼII β 結合活性を有する。このタンパク質のアミノ酸配列と塩基配列とを配列番号3および5に示す。TopBP2は392アミノ酸からなる分子量44,336のタンパク質であり、いずれも*in vitro*で合成したトポイソメラーゼII β のC-末端領域と相互作用する。このタンパク質のアミノ酸配列と塩基配列とを配列番号1,2および4に示す。

【0031】TopBP1およびTopBP2についてBLAST(basic local alignment search tool)を用いてホモロジー検索地Aという)を用いて、形質転換体を選択する。陽性クローニングを行った結果、TopBP1が、Rad4, Cut5, Ect2, Rev1およびトロンをとり、トポイソメラーゼII β 結合活性を有するヒXRCC1に含まれる領域に相同な8つの領域およびポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼの自己修飾部位と相同な領域を有することが示され、TopBP2は概日時計調節因子(circadian clock regulated factor)であるノクツニン(nocturnin)に含まれる領域と同一性を有することが示される。

【0032】また、TopBP2においては、アミノ酸番号87~392(配列番号1)に該当する領域が、トポイソメラーゼII β 結合活性を有する。このような活性を有するタンパク質は、例えば、遺伝子工学的な手法により、以下のようにして単離、精製することができる。ヒトTopBP2に例をとって説明する。

【0033】まず、目的とするTopoII β の遺伝子の所定の領域を、通常の条件でPCRを行って増幅する。この増幅においては、鋳型として各種のcDNAを用いることができるが、ヒト腎から調製されたcDNAを使用する。プライマーとしては、例えば、配列番号8および9に記載の塩基配列を有するものを用いる。このときの増幅には、94℃、1分、55℃、1.5分、72℃3分を1サイクルとして30回行い、最後に72℃で10分反応させるといった条件が好適である。

【0034】このようにして得た増幅産物を、適当なプラスミドにクローニングしてベイトプラスミドを構築する。ベイトプラスミドとは、ツーハイブリッド法に用い

るプラスミドをいう。ベイトプラスミドの構築に使用するプラスミドとしては、pEG202を使用することができ、上記の増幅産物(TopoII β 遺伝子)をpEG202にクローニングしてpK835を作成する。

【0035】について、適当な系(システム)を用いて酵母を形質転換する。このような系としては、酵母のツーハイブリッドシステム(two-hybrid system)を使用することが、特定のタンパク質を取得することができるために好ましい。この系においては、酵母を増殖させ、リポーター遺伝子とベイトプラスミドとを用いて、標準的な条件で酵母を形質転換させる。この系で形質転換する酵母は、*S. cerevisiae* EGY48をはじめとして、各種の酵母を使用することができるが、*S. cerevisiae* EGY48を使用することが好ましい。リポーター遺伝子としては、pSH18-34、pSH18-8、pSH18-3などを使用することができるが、pSH18-34を使用することが好ましい。形質転換は、リチウム-ポリエチレングリコールを使って行うことが好ましい。

【0036】について、以上のようにして得られた形質転換体に、所定の細胞のcDNAライブラリーを導入する。導入するcDNAライブラリーとしては、HeLa細胞が使用できる。適当な条件、例えば、ロイシン不含、80mg/LのX-gal、2%のD-ガラクトース、6.7g/Lのyeast nitrogen base、0.6g/Lのdropout powderを含む培地(以下、合成培地)を用いて、形質転換体を選択する。陽性クローニングを行った結果、TopBP1が、Rad4, Cut5, Ect2, Rev1およびトロンをとり、トポイソメラーゼII β 結合活性を有する領域を含む陽性のcDNAクローン(pre)で再度これを形質転換してその表現型を確認する。再度形質転換を行うことにより、pK835-1のクローンを得ることができる。

【0037】このようにして、得られたクローンから産生されるタンパク質のトポイソメラーゼIIとの相互作用を調べ、アミノ酸配列を常法に従って決定する。アミノ酸配列は、ジデオキシ法もしくはマクサム-ギルバート法などによって決定することができる。

【0038】以上のようにして、図1に模式的に示すヒトのトポイソメラーゼII β とヒトのTopBP2を得ることができる。また、TopBP1もTopBP2と同様にして得ることができる。本発明のTopBP2とトポイソメラーゼIIとの結合を阻害する物質のスクリーニングは、下記のとおりである。

【0039】本発明のスクリーニング方法において使用する検体は、溶液に溶解または懸濁できるものであればよく、特に限定されない。例えば、有機、無機の各種の合成化合物、動植物から種々の方法を用いて得たタンパク質などの天然の化合物などを挙げるができる。より具体的には、ヒトの血液、リンパ液などの各種の体液や組織を検体として用いると、トポイソメラーゼIIの活性を指標として、細胞増殖活性を知ることができ、上記の組織の増殖が正常かどうかを確認することができるという利点がある。

【0040】本発明のスクリーニング方法においてトポイソメラーゼIIとトポイソメラーゼIIに結合する活性を有するタンパク質(TopoBP)との反応は、上記の検体を常法に従って通常のタンパク質の結合反応に用いられる溶液に溶解または懸濁液させ、通常酵素と他の物質の結合反応を行う温度範囲で行う。このような溶液としては、リン酸バッファー、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、ハンクスバッファー(HBSS)などの各種緩衝液を挙げることができる。また、上記の溶液と、例えば、ジメチルスルホキシド(DMSO)、エタノールなどの有機溶媒とを適宜混合して、反応溶液として用いてもよい。反応時間は、例えば、5〜120分程度とすることが好ましい。

【0041】例えば、ウサギ網状赤血球ライセートシステム(Amersham)を用いて反応させる場合を例にとり、具体的に説明する。12.5倍濃縮の翻訳溶液(メチオニン不含)、2.5mM酢酸カリウム2μL、25mM酢酸マグネシウム、 ^{35}S メチオニン(43TBq/mmol, 2.9MBq)4μL、2μg RNA、20μLのウサギ網状赤血球ライセートを全体量50μLになるように水を加え、30℃で60分間保温する。TopBP1もしくはTopBP2とグルタチオン(GST)との融合タンパク質を吸着させたグルタチオンセファロース(25μL)を20mM Tris-HCl(pH7.7)、100mM NaCl、1mM EDTA、0.5% Nonidet P40で洗浄し、上記の翻訳溶液15μLと検体の存在下に混合し、30分間氷上に置く。これを20mM Tris-HCl(pH7.7)、100mM NaCl、1mM EDTA、0.5% Nonidet P40で5回洗浄する。グルタチオンセファロース画分をポリアクリルアミド電気泳動し、吸着したトポイソメラーゼIIを検出することにより、TopBP2に結合する活性を有するタンパク質の存在を確認することができる。

【0042】検体の存在下で生成されたトポイソメラーゼIIとTopoBPとの複合体は、例えば、以下のような方法で測定することができる。TopoBPを、 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{32}P などの放射性同位体、フルオレセインなどの蛍光化合物、その他の標識物質で標識し、トポイソメラーゼIIと結合していないTopoBPを抗体などによって除き、複合体中の標識の活性を測定することにより、複合体の生成量を測定することができる。標識が放射性同位体の場合にはシンチレーションカウンタを用いて、また、蛍光物質の場合には蛍光検出器を用いてというように、標識の検出に適した検出器を使用すればよい。

【0043】また本発明のスクリーニング方法では、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する上記のタンパク質と特異的な吸収スペクトルを有する化合物もしくは特異的な検出が可能な化合物とを反応させて複合体を形成させ、ここで形成された複合体をタンパク質結合活性を有する担体を用いて濾過し、上記複合体と未結合の化合物とを分離し、濾液中に存在する未結合の化合物を検出することもできる。ここで使用する特異的な吸収スペ

クトルを有する化合物とは、分光光度計で検出することができる範囲に特異的な吸収スペクトルを有する化合物または蛍光を有する化合物をいい、例えば、アフラトキシンG1(Aflatoxin G1)、アドレノステロン(Adrenosterone)、フルオレセインなどを挙げることができる。

【0044】特異的な検出が可能な化合物とは、 ^1H 、 ^{13}C または ^{64}Cr などの放射性同位体を含む化合物、ビタミン・ホルモンなどの生理活性物質、その他特異的反応でその存在を確認することができる物質などをいう。その他特異的反応でその存在を確認することができる物質の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどを挙げることができる。

【0045】トポイソメラーゼIIと上記の化合物との結合は、約30〜約37℃、好ましくは37℃前後で、通常酵素の反応に使用される上述のようなバッファー中で行うと、複合体が速やかに形成されるという利点がある。トポイソメラーゼIIと上記の化合物とが結合して生成された複合体は、タンパク質結合活性を有する担体を用いて未結合のトポイソメラーゼIIおよび上記化合物と分離する。

【0046】「タンパク質結合活性を有する担体」は、トポイソメラーゼIIに結合する活性を有する上記のタンパク質と特異的な吸収スペクトルを有する化合物とを反応させて形成した複合体を未結合体と分別できるものであればよく、特に限定されない。具体的には、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレンなどを挙げることができ、ニトロセルロースメンブレンを使用することがこれらを分離する上で好ましい。タンパク質結合活性を有する担体の形状は特に限定されないため、複合体を分離するにあたっては、上記のメンブレンを使用する他に、タンパク質結合活性を有する粒子状の担体を検体を含む反応溶液中に直接加える方法や、カラムに詰めてここに検体を含む反応溶液を通す方法など、各種の方法を採用することができる。

【0047】分離された未結合の化合物は、使用した化合物が特異的な吸収スペクトルを有する波長を用いて、UV検出器、蛍光検出器などを用いて検出する。例えば、このような化合物としてAflatoxin G1を用いた場合には362nm、Adrenosteroneを用いた場合には235nmで吸光度を測定することにより、反応溶液中のTopoBPタンパク質に結合する物質を定量的または定性的に検出することができる。また、フルオレセインを用いた場合には、励起波長として493 nm、測定波長として510 nmを用いることにより、上記と同様に検出することができる。

【0048】また、トポイソメラーゼII-TopoBPタンパク質複合体に結合する化合物は、以下のようにしてスクリーニングすることができる。まず、TopoBPタンパク質とトポイソメラーゼIIとを反応させて第一複合体を形成させ、次にこの第一複合体と特異的な吸収スペクトルを有する化合物とを反応させて第二複合体を形成させ、タン

パク質結合活性を有する担体を用いてこの第二複合体を濾過し、複合体と未結合の化合物とを分離し、濾液中に存在する未結合の化合物を検出する。

【0049】TopBPとトポイソメラーゼとを結合させて第一複合体を形成させる条件は、上記の通りである。ついで、特異的な吸収スペクトルを有する化合物をこの第一複合体を含む反応溶液に加えて、第一複合体を形成させる条件と同様の条件で反応させ、第二複合体を形成させる。ここで使用する特異的な吸収スペクトルを有する化合物は、上記の通りである。

【0050】ついで、第二複合体を、上記同様にタンパク質結合活性を有する担体を用いて未結合の化合物と分離する。分離した特異的な吸収スペクトルを有する化合物を、上述のようにして検出することにより、トポイソメラーゼ-TopBP複合体に結合する化合物をスクリーニングすることができる。

【0051】さらに、本発明のTopBPタンパク質を用いて、トポイソメラーゼ-TopBPタンパク質複合体におけるトポイソメラーゼ活性を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。すなわち、TopBPタンパク質とトポイソメラーゼとを反応させて第一複合体を形成させ、この第一複合体と化合物とを反応させて第二複合体を形成させ、ついで第二複合体の形成時におけるトポイソメラーゼの活性を検出することにより、トポイソメラーゼ-TopBPタンパク質複合体におけるトポイソメラーゼ活性を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。TopBPタンパク質とトポイソメラーゼとを反応させて第一複合体を形成させる条件、およびこの第一複合体と化合物とを反応させて第二複合体を形成させる条件は上記と同様である。

【0052】このスクリーニング方法において、第二複合体の形成時におけるトポイソメラーゼの活性の検出は、以下のようにして行う。すなわち、約30〜約37℃の温度、好ましくは、37℃前後で、上記のようなバッファーと適当な基質DNAとを用いて5〜120分間反応させ、反応生成物をアガロースゲル電気泳動で検出する。基質としては、スーパーコイル状DNAなどを挙げるができる。以上のようにして、トポイソメラーゼ-TopBPタンパク質複合体におけるトポイソメラーゼ活性を阻害する化合物をスクリーニングすることができる。

【0053】上述のようにして得たTopBPタンパク質とトポイソメラーゼとの結合を阻害する化合物、TopBPタンパク質に結合するタンパク質、TopBPタンパク質-トポイソメラーゼ複合体に結合する化合物、およびTopBPタンパク質-トポイソメラーゼ複合体におけるトポイソメラーゼ活性を阻害する化合物は、トポイソメラーゼがDNAの複製に関与する酵素であることから、悪性腫瘍をはじめとする細胞の異常増殖を生ずる疾患の治療のための薬剤として使用することができる。

【0054】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1) TopBP1の単離および精製

(1) プラスミドの構築

ヒトトポイソメラーゼIIβ遺伝子のC-末端領域をPCRで増幅した。鋳型としては、ヒト腎から調製されたcDNA (Quick-clone, Clontech) を使用した。プライマーとしては、配列番号8および9に記載の、5'-GGATCCGGTCAAAGA AAGATTTGATTCAAATG-3' (配列番号8) と、5'-GATTTGTTG AAAAATGTTTGTC-3' (配列番号9) とを用いた。配列番号6に記載のトポイソメラーゼIIβのアミノ酸残基1, 143-1,621に対応する領域を、pEG202のBamHI-XhoI部位にクローニングし、lexAを保持するpK835 (ベイト (bait) プラスミド) を構築した。

【0055】(2) 酵母のツーハイブリッドシステム (two-hybrid system)

この系は、ハーバード大学医学部のRoger Brent博士より贈られたものである。スクリーニングは、以下のように行った。リポーター遺伝子であるpSH18-34は、Roger Brent博士 (Harvard Medical School Boston, MA) から入手した (Jen Gyuris et al., Cell, 75:791-803 (1993))。

【0056】酵母としては、*S. cerevisiae* EGY48を、30℃にて、ヒスチジン不含(His⁻)、トリプトファン不含(Trp⁻)の合成A培地で終夜培養し、細胞を回収して洗浄した。ついで、OD₆₀₀が0.1になるように、2%グルコースを含有する新鮮な培地で希釈した。OD値を2時間ごとに測定しつつ、この酵母を増殖させた。標準的な方法に従って (Ausubelら、1987〜1993)、上記のように増殖させた*S. cerevisiae* EGY48を、上記のpSH18-34 (リポーター) と上記(1)で構築したpK835とで形質転換した。

【0057】ついで、HeLaのcDNAライブラリー (Jen Gyuris, et al., Cell, 75:791-803 (1993)、Roger Brent博士 (Harvard Medical School Boston, MA) より入手) を形質転換体に導入した。2%アガロースを含む合成培地A中、30℃で2日間培養した。2日後、レプリカにより、pSH18-34、pK835およびcDNAプラスミドを含む約10⁷個の独立のクローンを、ロイシン不含、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルβ-D-ガラクトピラノシド (X-gal) およびD-ガラクトースを含む培地上で、30℃で7日間増殖させた。

【0058】トポイソメラーゼIIβ結合活性を有する領域を含む陽性のcDNAクローン (prey) で、pSH18-34とpK835とを有するEGY48 (以下、EGY48 (pSH18-34, pK835) という) を再度形質転換し、陽性の表現型を確認した。HeLa細胞の発現cDNAライブラリーから得られたβ-ガラクトシダーゼ陽性クローン全体の約30% (9.6×10⁶個の独立のクローン) をさらに分析した。ただ1つのクローンが、生物学的に確認されたタンパク質-タンパク質相互

作用を示した。このクローン(図1B、prey)はトボイソメラーゼIIβタンパク質のC-末端領域と同一であり、その機能は不明である(Nomura, EMBL:受託番号D87448)。このタンパク質をTopBP1と命名した(トボイソメラーゼIIβ結合タンパク質)。

【0059】(3) DNA配列の決定

TopBP1のDNA配列は、Applied Biosystems社製のPrism プライマー(p55-18)

5'-GCTTCAAACGCCTTCTTCAGTCAGGAGGAGC-3' (配列番号10)

とAP1プライマーとを用いて、第1回のPCRを行った。これを鋳型として以下の配列を有するプライマー(p55-1

5'-TAATATAGCAGAAGCTGCTGCCAGAACGTG-3' (配列番号11)

とAP2プライマーとを用いて第000のめのPCRを行った。

【0061】最も長いmRNAの5'末端を決定するために、以下の3種類の実験を行った。第一の実験には、HeLa細胞から予め作製されたcDNAによる5' RACE法(MarathoncDN

5'-AGGTGATCAAAGACAACGCCACTAAAAGGG-3' (配列番号12)

とAP1プライマーとを用いて、第1回のPCRを行った。これを鋳型として以下の配列を有するプライマー(p55-2

5'-TTCTGAACCTCGTTGGAGCCTCGGGGTCTCC-3' (配列番号13)

とAP2プライマーとを用いて第2回のめのPCRを行った。この方法によって確実に決定されたこの5'末端は、データベースの配列(EMBLD87448)中の配列とほぼ同一であったが、6塩基(5'-GGCGCC-3')短いものであった。

【0062】第二の実験では、1段階精製によって不安定なmRNAを調製し、タンパク質とRNA分解物質(degrader)を新鮮な細胞に直接添加することによって、HeLa細胞に対する過大なストレスを最小限にした(FastTrack, Invitrogen)。第三の実験では、胎盤由来のmRNAを使用した。第二の実験同様、このcDNAでもRACE分析においてより長い5'末端は得られなかった。

【0063】TopBP1の最大の転写物からの推定DNAおよびアミノ酸配列を図2Aに示した。mRNAが不安定であるためにmRNAの5'末端がさらに長いかもしれないという可能性は排除しきれない。得られた15個のクローンについてTopBP1の3'領域を含むかどうか、およびそれらの制限パターンを検討した。制限パターンの検討に使用した制限酵素は、EcoRIである。TopBP1の3'-領域から単離された5個のクローンは同じ制限パターンを示した。他の10個のクローンには3'領域に関連する遺伝子が含まれていなかった。

【0064】もとのクローンと同一の3'領域は、検討した15個のクローンでは認められなかった。3' RACE法の結果をも勘案して、もとのクローンの3'領域はマイナーなケースかまたは人工的に生じたものであると考えられた。もとのクローンには3'非翻訳末端にmRNA不安定化モチーフがないことが明らかになり、これによってmRNAの安定化とツーハイブリッドシステムによるクローンの検出ができることが示された。12セットのmRNA不安定化モチーフと2つの推定核局在化シグナルとを含む最も長い転写物は、1,522 アミノ酸残基をコードしていた(分子量

10シーケンサーを用いて決定した。TopBP1遺伝子の3'-領域については、Marathon-ready cDNAキット(Clontech社製)を用いてDNA端の3'-RACE(the 3'-rapid amplification on cDNA ends)法によって決定した。

【0060】すなわち、キットに付属のHeLa細胞由来の鋳型cDNAを使用し、下記の配列を有する遺伝子特異的な

9)

A, Clontech)を使用した。キットに付属のHeLa細胞由来の鋳型cDNAを使用し、下記の配列を有する遺伝子特異的なプライマー(p55-16)

0)

170,670)。

【0065】(4) TopBP1の配列と他のタンパク質の配列との比較

基本的ローカルアライメント検索ツール(basic local alignment search tool, BLAST, Stephen F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-414(1990))を用いて、TopBP1の配列を他のタンパク質の配列とデータベースで比較した。

【0066】結果を図3に示す。図3Aには、示されたタンパク質とTopBP1とのアミノ酸残基とのアライメントを示す。図3A中、=は疎水性の残基を、&は親水性残基(S/TもしくはK/R/HもしくはE/DまたはN/Q)をそれぞれ示す。コンセンサス配列は、塩基が同一または50%以上類似している場合に、影をつけて示した。

【0067】図3Bには、TopBP1、Rad4/Cut5、Rev1、Ect2およびXRCC1を模式的に示した。斜線を付した枠内の数字は、図3Aに列挙した各タンパク質に付されたかっこ内の数字に対応するものである。枠内のタンパク質を構成するアミノ酸残基の総数を、各タンパク質を示す枠の右側に示した。Rev1はDNA修復タンパク質であるUmuCと類似の領域を含み、Ect2は小さなGTP-結合タンパク質のGTP-交換因子に類似の領域を含む。

【0068】図3Aおよび3Bで示したように、TopBP1は損傷されたDNA鎖の修復に関与する幾つかのタンパク質、具体的には、Rev1、Rad4/Cut5、XRCC1、およびEct2といったタンパク質中の特定の領域と相同性を有することが明らかになった。ここで、Rev1は、DNA修復機能を有し、化学物質に対する正常な「変異の誘導」に関与する。Rad4タンパク質は紫外線および放射線によって損傷されたDNAを修復する機能を有し、S-期の完了前にS期

の開始とM期の抑制にとって必要とされるCut5と同一である (Saka, Y., and Yanagida, M., Cell 74:383- (1993))。XRCC1タンパク質は電離放射線およびアルキル化剤で処理された鎖の切断の修復に関与する。Ect2は、GTPase活性化酵素の機能を有し、細胞の形質転換に関与する。

【0069】TopBP1はRad4タンパク質の第1および第2領域と相同な8個の繰り返し領域 (第1～第8領域) を有していた。TopBP1の第1および第2領域はまた、XRCC1タンパク質の第一領域と同一性を有していた。以上のような同一性の検討から、トポイソメラーゼIIはその触媒反応の間、DNAを一時的に切断し、TopBP1がDNA鎖の修復に関与する可能性をも有することが示唆された。TopBP1は、トポイソメラーゼIIの触媒反応をサポートするシャペロンのように機能するかもしれない。

【0070】Rev1タンパク質はバクテリアのUmuC DNA修復タンパク質を含み、第1領域中でGly-193がArgに変化するRev1の突然変異は試薬による突然変異を誘導する。Gly-193は保存されたGly残基 (図3A) に対応する。Ect2プロトオンコジンのN-末端領域は、トランスフォーミング活性に対して負の効果を有することが示された。Ect2は、低分子型GTP結合タンパク質のGTP-交換因子に類似の領域を含む。

【0071】図3Cに示された領域は、ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) の自己 (ADP-リボシル) 化部位に相同であり、ポリ (ADP-リボシル) 化によって種々の核タンパク質を修飾し、DNAの修復を調節する。こうして、TopBP1はポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) の考えられる基質であり得る。加えて、この領域はPARPのジンクフィンガーモチーフを含まないが、DNA結合ドメイン中に短い相同体が表れた。

【0072】Rad4はCut5と同じであり、S期の開始とS期の完了前のM期の抑制の前に必要であることが示されており、THLIアミノ酸配列を含むXRCC1の第一領域がRad4の領域で複製されることが報告されている。TopBP1は8個の相同領域を有する (図3Aおよび3B)。Ect2プロトオンコジンのN-末端領域のトランケーションはそのトランスフォーミング活性を誘導する。切出されたCut5/Rad4の第一領域はモチーフに入るときに負の効果を与えることを示され、このことは、TopBP1が細胞周期を調節していることを示唆した。Rev1タンパク質はバクテリアのUmuC DNA複製タンパク質と相同な領域を含む。第一領域におけるRev1タンパク質の突然変異 (Gly-193からArgへ) は試薬によって誘導されるものである。Gly-193は保存されたGly残基に相当する (図3A)。

【0073】Cut5の局在化は、*S. pombe*におけるトポイソメラーゼIIタンパク質のそれに類似する。このことは、TopBP1がトポイソメラーゼと相互作用するという結果に関連する。Cut5の切出された第一領域はG2期で細胞周期をブロックすることが示された。TopBP1の増加して

いる繰り返し領域および発癌性領域の欠落という特徴は、Ect2プロトオンコジーンよりもCut5により類似しており、このことはTopBP1が複製のチェックポイントで正の調節を行い、M期のキナーゼの活性化で負の調節を行っていることを示した。繰り返し領域は共通タンパク質に結合し、これらの機能を発現させることができる。

【0074】TopBP1の他の領域は、ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼの自己 (ADP-リボシル) 化部位に相同であり、ポリ (ADP-リボシル) 化によって種々の核タンパク質を修飾し、DNAの修復を調節する。こうして、TopBP1は、ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ (PARP) の考えられる基質となり得るため、DNAの修復に関与することが示唆されている。

【0075】TopBP1のmRNAは12個のAUUUAモチーフを有し、mRNA上での不安定性を付与する。ノーザンブロット分析により、一貫して、mRNAの特別な不安定性を有する、TopBP1転写物のテリングパターンが示された。TopBP1のmRNAは非常に不安定であり、このことはmRNAの1段階精製を注意深く行う間に新鮮なHeLa細胞にタンパク質とRNase分解剤を直接加えたときに、他のノーザンブロット分析で同様なテリングパターンが示されたことによる (データは示していない)。

【0076】(5) 融合タンパク質の産生
ライブラリー中で陽性のシグナルを与えるpK835-1のcDNA領域を、pGEX-5X-1 (ファルマシア社製) のEcoRI-XhoI部位にクローニングし、pK835-55Gを構築した。グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質を産生させるために、*E. coli* JM83を0.34mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) の存在下にLブロス中で、37℃にて3時間培養した。ついで、回収した細胞を、10mgのフェニルメタンスルフォネートフロリドを含む10mMのライシスバッファー (10mMのトリス-HCl (pH7.7)、0.5MのNaCl) 中でソニケートした。遠心後、溶解物 (0.1～1.5mL) をグルタチオンセファロースビーズ (50%スラリーの20μL, Pharmacia) とともにインキュベートした。ついで、ビーズを溶解バッファーで3回洗浄した。5μLの5mMのグルタチオン (GSH)、10mMのトリス-HCl (pH7.7) をこのビーズに添加し、5分間インキュベートした。10μLのゲルローディングバッファーを直接サンプルに添加し、そして3分間沸騰させた。ついで、タンパク質を5～20%のグラジエントポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。

【0077】(6) in vitroアッセイ
ヒトトポイソメラーゼIIβ遺伝子のEcoRI (部分精製した) -XhoI断片のC-末端領域を、cap非依存性翻訳エンハンサー (translational enhancer) を保持する、pCITE-2a(+) (Novagen社製) のEcoRI-XhoI部位にクローニングし、pK853を構築した。in vitroの転写は、標的遺伝子の3'末端遺伝子をXhoIで直鎖化したpK853を用いて、製造元 (Promega社製) の使用説明書に従い、T7 RNAポリ

メラゼで行った。In vitroの翻訳は、レティキュロサイトライセートシステム (reticulocyte lysate system, Amersham社製) にて、 ^{35}S | メチオニン (43TBq/mmol, 2.9MBq) の存在下に、2 μL の転写されたRNAを用いて、最終容量50 μL で行った。ビーズ上に固定された融合タンパク質を、洗浄バッファー (20mM トリス-HCl (pH 7.7), 100mM のNaCl, 1mM のEDTA, 0.5% のNonidet P4) で洗浄し、翻訳された産物と混合した。混合物を氷上で30分間インキュベートし、ついで、5回、洗浄バッファーで洗浄した。固定されたタンパク質の溶出は上記のとおりに行った。

【0078】(7) ノーザンブロット分析
マルチプライムDNAシステム (Amersham) を用いて、 ^{32}P | 標識プローブを調製し、複数の組織のノーザンメンブラン (Clontech) に直接添加し、製造元の使用説明書に従って洗浄した。メンブランをFUJIX BAS 2000イメージアナライザーで分析した。

【0079】ノーザンブロット分析により、アクチン転写物 (図4B) とは対照的なTopBP2転写物のテーリングパターンが示された (図4B)。TopBP2のmRNAは、mRNA上での不安定性を供与し、mRNAが分解することを示す。12セットのAUUUAモチーフ (図2A) を含む。さらに、より短いmRNAは別のスプライシングによって産生される。TopBP1のmRNAは強いストレスによって分解され、ヒトの組織から調製される。グルコースの枯渇と低酸素症を含むこのようなストレスは、固形腫瘍中におけるトポイソメラーゼIIの減少を生じさせ、このことは、他の分子と相互作用している2つの分子が、共通のストレス感受性の特徴をもっていることを示す。TopBP1関連転写物は、異なるレベルで試験した成人ヒトの組織の多くの部分に偏在し、心臓、脳、胎盤、肺および肝で比較的豊富である (図4A)。より大きな転写物 (>10キロベース) が心臓で観察された。他の組織における最大の転写物は、4.4~5.5kbであり、RACE法によって決定されたHeLa細胞における最大の転写物 (5.3kb) のサイズと一致した。

【0080】(8) TopBP1のin vitroでのトポイソメラーゼII β との相互作用の検討
生物学的な相互作用を確認するために、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) -TopBP1融合タンパク質をE. coli 中で合成させ、グルタチオンセファロースビーズで精製した。このビーズから溶出したタンパク質を図5Aに示す。トポイソメラーゼII β のC-末端領域をウサギの網状赤血球溶解系を用いてin vitroで合成した。このビーズを洗浄し、ついで会合タンパク質を分析した (図5B)。トポイソメラーゼII β のC-末端領域は、TopBP1と特異的に相互作用した (レーン2)。

【0081】トポイソメラーゼII β のC-末端領域は、TopBP1と特異的に相互作用する。結合効率は低い (0.042%) が、この傾向はTopBP1および別のトポイソメラーゼI

I結合タンパク質であるSgs1 (Watt, P.M., Louis, E. J., Borts, R.H., and Hickson, I.D. (1995) Cell 81: 53-260) においても観察された。他方で、ツーハイブリッドシステムは強い陽性シグナルを与え、このことは、リン酸化などの翻訳後修飾が2つの分子の強い相互作用のために必要とされ得ることを示唆した。このアイデアもまた、in vitroにおける結合がE. coli 中で合成されたトポイソメラーゼII β のC-末端領域上で観察されないという証拠によって支持される。

【0082】ウェルナー症候群の遺伝子およびブルーム症候群の遺伝子はDNAヘリカーゼを、一部分コードしていることが明らかになった (Kurosaki, T., et al., J. Biol. Chem. 262: 15990-15997 (1987) and Lehmann, A. R. Nucleic Acids Res. 21 (1993)) ことは、世界的に耳目を集めることとなった。酵母のトポイソメラーゼII結合タンパク質であるSgs1もまたDNAヘリカーゼであり (Watt, P.M., et al., Cell 81: 253-260 (1995))、そのため、トポイソメラーゼIIとそれに相互作用するタンパク質は、基本的な生物学的現象およびヒトの疾病において重要な役割を果たすことができる。TopBP1はヘリカーゼとは異なるため、残っているクローンをさらに分析し、トポイソメラーゼII結合タンパク質を系統立てて研究することが必要である。最後に、TopBP1は抗腫瘍剤の新規な分子標的となるはずであり、トポイソメラーゼIIと協同して作用することができることから判断される。

【0083】(実施例2) TopBP2の単離および精製
TopBP2の単離には、実施例1で使用したプラスミドと同様のものを使用した。

(1) 酵母のツーハイブリッドシステム (two-hybrid system)
HeLaのcDNA発現ライブラリーを、pSH18-34 (リポーター) とpK835 (バイト) とを用いて形質転換したEGY48中に導入した。2日後、pSH18-34、pK835およびcDNAプラスミドを含む約107個の独立のクローンを、ロイシン不含有、5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドイル β -D-ガラクトピラノシド (X-gal) およびD-ガラクトースを含む培地上で増殖させた。

【0084】ヒトトポイソメラーゼII β のC-末端領域と相互作用するタンパク質を検出するために (図1A)、R. Brent博士および彼の同僚達によって改良されたツーハイブリッドシステムを用いた。HeLa細胞発現cDNAライブラリーからの総 β -ガラクトシダーゼ陽性クローンの約30% (9.6×10^6 個の独立のクローン) をさらに分析した。最初に、TopBP1断片 (図1B) が生物学的に確認されたタンパク質-タンパク質相互作用を示した。我々は、in vitroにおける結合アッセイ中でGST融合体のタンパク質濃度を高めようとした (5倍)。この手順によって、新たな融合タンパク質がin vitroでタンパク質-タンパク質相互作用を示した。トポイソメラーゼII β 結合タンパク質2についてタンパク質TopBP2と命名した

た。混合物を氷上で30分間インキュベートし、ついで、6回、洗浄バッファーで洗浄した。7 μ l のゲルローディングバッファーを直接にサンプルに添加し、3分間沸騰させた。

【0088】(5) TopBP2の配列の類似性の検討

基本的ローカルアライメント検索ツール (basic local alignment search tool, BLAST) を用いて、データベースで、TopBP2配列を他のタンパク質と比較した。図3Aに示すように、TopBP2は概日時計制御因子 (circadian clock-regulated factor) であるnocturninの領域と相同な領域を有する。nocturninの機能は同定されていないが、タンパク質-タンパク質相互作用を介して機能できる転写因子であることが示唆されている。

【0089】TopBP2は、ヒトアデノウイルスのDNA末端

タンパク質の領域と相同な領域を有する。末端タンパク質はDNAを複製する末端に共有結合で接着しており、ウイルスDNAの複製において何らかの役割を果たしているかもしれない。興味深いことに、トポイソメラーゼIIもまたDNAのニック部位と共有結合でつながれた中間体を形成する。

【0090】TopBP1はRad4/Cut5、XRCC1タンパク質と相

同な8つの繰り返し領域を有し、紫外線および電離放射線の照射によるDNAの傷害を修復する。興味深いことに、トポイソメラーゼIIもまた、触媒反応の間、DNAにおいて一過性の傷害をつくる。TopBP1はトポイソメラーゼIIの触媒反応の失敗によって生じるDNA鎖の修復に関与し得ることが期待される。Cut5タンパク質の研究によって、TopBP1が複製のチェックポイントを正の方向に制御し、M期のキナーゼの活性化を負の方向に制御できることを示唆した。8つの繰り返し領域は、共通のタンパク質に結合してこれらの機能を発現することができる。

【0091】(6) ノーザンブロット分析

ノーザンブロット分析により、アクチン転写物とは対照的なTopBP2転写物のテーリングパターンが示された(図4A)。TopBP2のmRNAは、mRNA上での不安定性を供与し、mRNAが分解することを示す、5セットのAUUUAモチーフを含む。さらに、mRNAは別のスプライシングによって産生される。TopBP2のmRNAは一定の時間の経過後にヒトの組織から調製される、非常に強いストレスによって分解される。グルコースの枯渇と低酸素症を含むこのようなストレスは固形腫瘍中におけるトポイソメラーゼIIの減少を生じさせ、このことは、他の分子と相互作用している2つの分子が、共通のストレス感受性の特徴を持っていることを示す。TopBP2関連転写物は、成人ヒトでは、心臓、胎盤、肺および肝で比較的豊富である(図4A)。大きな転写物(>10キロベース)が心臓で観察された。

【0092】TopBP2のmRNAは5セットのAUUUA モチーフ

A、を有し、mRNA上での不安定性を付与する。ノーザンブロット分析により、一貫して、mRNAの特別な不安定性を有

する、TopBP2転写物のテーリングパターンが示された。このモチーフは、しばしば、重要なガン遺伝子およびサイトカインのmRNA中で観察された。TopBP1タンパク質とTopBP2タンパク質の量は厳密に制御されていると考えられる。

【0093】(7)TopBP2はin vitroでトポイソメラーゼII β と相互作用する

生物学的な相互作用を確認するために、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)-TopBP2融合タンパク質をE. coli中で合成させ、グルタチオンセファロースビーズで精製した。このビーズから溶出したタンパク質を図5Aに示す。トポイソメラーゼII β のC-末端領域をウサギの網状赤血球溶解液系を用いてin vitroで合成した。このビーズを洗浄し、ついで会合タンパク質を分析した(図5B)。

【0094】トポイソメラーゼII β のC-末端領域は、TopBP2と特異的に相互作用する。結合効率は低い(0.6%)が、この傾向もまたTopBP1および別のトポイソメラーゼII結合タンパク質であるSgs1において観察された。他方で、ツーハイブリッドシステムは強い陽性シグナルを与え、このことは、リン酸化などの翻訳後修飾が2つの分子の強い相互作用のために必要とされ得る。このアイデアもまた、in vitroにおける結合がE. coli中で合成されたトポイソメラーゼII β のC-末端領域上で観察されないという証拠によって支持される。

【0095】複数のTopBPがトポイソメラーゼIIの活性を変化させるかどうかについて試験した。細菌中で発現されたTopBPは、DrosophilaからのトポイソメラーゼIIのリラクゼーション活性を変化させなかった。現在、ヒトトポイソメラーゼII β の精製を進めている。

【0096】ウェルナー症候群の遺伝子およびブルーム症候群の遺伝子はDNAヘリカーゼを、一部分コードしていることが明らかになったことは、世界的に耳目を集めることとなった。酵母のトポイソメラーゼII結合タンパク質であるSgs1もまたDNAヘリカーゼであり、そのため、トポイソメラーゼIIとそれに相互作用するタンパク質は、基本的な生物学的現象およびヒトの疾病において重要な役割を果たすことができる。

【0097】TopBP1とTopBP2とはヘリカーゼとは異なるため、残っているクローンをさらに分析し、トポイソメラーゼII結合タンパク質をシステムチックに研究した。近年、有糸分裂におけるクロマチドの分離がbarren産物に必要であることが示され、この産物はDrosophilaにおけるトポイソメラーゼIIと相互作用する。barrenはヒトの相同体を有する新規なタンパク質をコードするが、TopBP1およびTopBP2とは異なる。最後に、複数のTopBPは抗腫瘍剤の新規な分子標的となるはずであり、トポイソメラーゼIIと協同して作用することができることから判断される。トポイソメラーゼII β のC-末端領域は、TopBP2と特異的に相互作用した(レーン2)。

【0098】以上より、DNAトポイソメラーゼII β は偏在する分子であり、酵母において複製と染色体の分離のために必須であることが知られている。しかしながら、トポイソメラーゼIIの制御機構はほとんど理解されていない。そこで、新規なヒトトポイソメラーゼII結合タンパク質、TopBP2を同定した。TopBP2は、DNAの切断/再結合領域と制御領域との間に結合する(図1A)。TopBP2の機能は、さらに調査すべき部分が残っている。

【0099】

【発明の効果】本発明の方法によれば、トポイソメラーゼII α および β の双方に結合する新規タンパク質であるTopBP1とTopBP2の遺伝子および遺伝子産物を得ることができる。また、TopBPとトポイソメラーゼIIとの結合を阻害する物質のスクリーニング方法が提供される。さらに、トポイソメラーゼ-TopBP複合体におけるトポイソメラーゼ活性阻害物質のスクリーニング方法が提供される。TopBPは細胞における遺伝子の複製、細胞増殖に関与している可能性があることから、抗癌剤の標的分子とすることができる。

【0100】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 306

配列の型: アミノ酸

配列の種類: ペプチド

配列

Ala	Leu	Asn	Ser	Tyr	Phe	Glu	Pro	Pro	Val	Glu	Glu	Ser	Ala	Leu	Glu
1				5					10					15	
Arg	Arg	Pro	Glu	Thr	Ile	Ser	Glu	Pro	Lys	Thr	Tyr	Val	Asp	Leu	Thr
			20					25					30		
Asn	Glu	Glu	Thr	Thr	Asp	Ser	Thr	Thr	Ser	Lys	Ile	Ser	Pro	Ser	Glu
			35					40				45			
Asp	Thr	Gln	Gln	Glu	Asn	Gly	Ser	Met	Phe	Ser	Leu	Ile	Thr	Trp	Asn
			50				55					60			
Ile	Asp	Gly	Leu	Asp	Leu	Asn	Asn	Leu	Ser	Glu	Arg	Ala	Arg	Gly	Val
65				70						75				80	
Cys	Ser	Tyr	Leu	Ala	Leu	Tyr	Ser	Pro	Asp	Val	Ile	Phe	Leu	Gln	Glu

				85					90					95					
Val	Ile	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Lys	Lys	Arg	Ser	Ser	Asn	Tyr				
			100					105					110						
Glu	Ile	Ile	Thr	Gly	His	Glu	Glu	Gly	Tyr	Phe	Thr	Ala	Ile	Met	Leu				
		115					120					125							
Lys	Lys	Ser	Arg	Val	Lys	Leu	Lys	Ser	Gln	Glu	Ile	Ile	Pro	Phe	Pro				
	130					135					140								
Ser	Thr	Lys	Met	Met	Arg	Asn	Leu	Leu	Cys	Val	His	Val	Asn	Val	Ser				
145					150				155						160				
Gly	Asn	Glu	Leu	Cys	Leu	Met	Thr	Ser	His	Leu	Glu	Ser	Thr	Arg	Gly				
			165					170						175					
His	Ala	Ala	Glu	Arg	Met	Asn	Gln	Leu	Lys	Met	Val	Leu	Lys	Lys	Met				
			180					185					190						
Gln	Glu	Ala	Pro	Glu	Ser	Ala	Thr	Val	Ile	Phe	Ala	Gly	Asp	Thr	Asn				
		195					200					205							
Leu	Arg	Asp	Arg	Glu	Val	Thr	Arg	Cys	Gly	Gly	Leu	Pro	Asn	Asn	Ile				
210						215					220								
Val	Asp	Val	Trp	Glu	Phe	Leu	Gly	Lys	Pro	Lys	His	Cys	Gln	Tyr	Thr				
225					230			235							240				
Trp	Asp	Thr	Gln	Met	Asn	Ser	Asn	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Ala	Cys	Lys				
			245					250						255					
Leu	Arg	Phe	Asp	Arg	Ile	Phe	Phe	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Glu	Gly	His				
			260					265					270						
Ile	Ile	Pro	Arg	Ser	Leu	Asp	Leu	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Leu	Asp	Cys				
		275					280					285							
Gly	Arg	Phe	Pro	Ser	Asp	His	Trp	Gly	Leu	Leu	Cys	Asn	Leu	Asp	Ile				
	290					295					300								
Ile	Leu																		
305	306																		

【0101】配列番号: 2

配列の型: アミノ酸

配列の長さ: 392

配列の種類: ペプチド

配列

Met	Arg	Glu	Arg	His	Asp	Thr	Gly	Ala	Cys	Ala	Glu	Pro	Arg	Val	Gly				
1				5					10					15					
Leu	Leu	Phe	Arg	Leu	Lys	Gly	Arg	Cys	Arg	Gly	Gly	Arg	Lys	Met	Glu				
			20					25					30						
Leu	Gly	Ser	Cys	Leu	Glu	Gly	Gly	Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Gly				
		35					40					45							
Glu	Pro	Glu	Val	Lys	Lys	Arg	Arg	Leu	Leu	Cys	Val	Glu	Phe	Ala	Ser				
	50					55					60								
Val	Ala	Ser	Cys	Asp	Ala	Ala	Val	Ala	Gln	Cys	Phe	Leu	Ala	Glu	Asn				
65					70				75					80					
Asp	Trp	Glu	Met	Glu	Arg	Ala	Leu	Asn	Ser	Tyr	Phe	Glu	Pro	Pro	Val				
				85				90					95						
Glu	Glu	Ser	Ala	Leu	Glu	Arg	Arg	Pro	Glu	Thr	Ile	Ser	Glu	Pro	Lys				
		100						105				110							
Thr	Tyr	Val	Asp	Leu	Thr	Asn	Glu	Glu	Thr	Thr	Asp	Ser	Thr	Thr	Ser				
		115					120					125							
Lys	Ile	Ser	Pro	Ser	Glu	Asp	Thr	Gln	Gln	Glu	Asn	Gly	Ser	Met	Phe				
	130					135					140								

Ser Leu Ile Thr Trp Asn Ile Asp Gly Leu Asp Leu Asn Asn Leu Ser
 145 150 155 160
 Glu Arg Ala Arg Gly Val Cys Ser Tyr Leu Ala Leu Tyr Ser Pro Asp
 165 170 175
 Val Ile Phe Leu Gln Glu Val Ile Pro Pro Tyr Tyr Ser Tyr Leu Lys
 180 185 190
 Lys Arg Ser Ser Asn Tyr Glu Ile Ile Thr Gly His Glu Glu Tyr
 195 200 205
 Phe Thr Ala Ile Met Leu Lys Ser Arg Val Lys Leu Lys Ser Gln
 210 215 220
 Glu Ile Ile Pro Phe Pro Ser Thr Lys Met Met Arg Asn Leu Leu Cys
 225 230 235 240
 Val His Val Asn Val Ser Gly Asn Glu Leu Cys Leu Met Thr Ser His
 245 250 255
 Leu Glu Ser Thr Arg Gly His Ala Ala Glu Arg Met Asn Gln Leu Lys
 260 265 270
 Met Val Leu Lys Lys Met Gln Glu Ala Pro Glu Ser Ala Thr Val Ile
 275 280 285
 Phe Ala Gly Asp Thr Asn Leu Arg Asp Arg Glu Val Thr Arg Cys Gly
 290 295 300
 Gly Leu Pro Asn Asn Ile Val Asp Val Trp Glu Phe Leu Gly Lys Pro
 305 310 315 320
 Lys His Cys Gln Tyr Thr Trp Asp Thr Gln Met Asn Ser Asn Leu Gly
 325 330 335
 Ile Thr Ala Ala Cys Lys Leu Arg Phe Asp Arg Ile Phe Phe Arg Ala
 340 345 350
 Ala Ala Glu Glu Gly His Ile Ile Pro Arg Ser Leu Asp Leu Leu Gly
 355 360 365
 Leu Glu Lys Leu Asp Cys Gly Arg Phe Pro Ser Asp His Trp Gly Leu
 370 375 380
 Leu Cys Asn Leu Asp Ile Ile Leu
 385 390 392

【0102】配列番号: 3

配列の型: アミノ酸

配列の長さ: 1522

配列の種類: ペプチド

配列

Met Ser Arg Asn Asp Lys Glu Pro Phe Phe Val Lys Phe Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 Ser Asp Asn Ser Lys Cys Phe Phe Lys Ala Leu Glu Ser Ile Lys Glu
 20 25 30
 Phe Gln Ser Glu Glu Tyr Leu Gln Ile Ile Thr Glu Glu Glu Ala Leu
 35 40 45
 Lys Ile Lys Glu Asn Asp Arg Ser Leu Tyr Ile Cys Asp Pro Phe Ser
 50 55 60
 Gly Val Val Phe Asp His Leu Lys Lys Leu Gly Cys Arg Ile Val Gly
 65 70 75 80
 Pro Gln Val Val Ile Phe Cys Met His His Gln Arg Cys Val Pro Arg
 85 90 95
 Ala Glu His Pro Val Tyr Asn Met Val Met Ser Asp Val Thr Ile Ser
 100 105 110
 Cys Thr Ser Leu Glu Lys Glu Lys Arg Glu Glu Val His Lys Tyr Val

115				120				125							
Gln	Met	Met	Gly	Gly	Arg	Val	Tyr	Arg	Asp	Leu	Asn	Val	Ser	Val	Thr
130				135				140							
His	Leu	Ile	Ala	Gly	Glu	Val	Gly	Ser	Lys	Lys	Tyr	Leu	Val	Ala	Ala
145				150				155				160			
Asn	Leu	Lys	Lys	Pro	Ile	Leu	Leu	Pro	Ser	Trp	Ile	Lys	Thr	Leu	Trp
165				170				175							
Glu	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Lys	Ile	Thr	Arg	Tyr	Thr	Asp	Ile	Asn	Met
180				185				190							
Glu	Asp	Phe	Lys	Cys	Pro	Ile	Phe	Leu	Gly	Cys	Ile	Ile	Cys	Val	Thr
195				200				205							
Gly	Leu	Cys	Gly	Leu	Asp	Arg	Lys	Glu	Val	Gln	Gln	Leu	Thr	Val	Lys
210				215				220							
His	Gly	Gly	Gln	Tyr	Met	Gly	Gln	Leu	Lys	Met	Asn	Glu	Cys	Thr	His
225				230				235				240			
Leu	Ile	Val	Gln	Glu	Pro	Lys	Gly	Gln	Lys	Tyr	Glu	Cys	Ala	Lys	Arg
245				250				255							
Trp	Asn	Val	His	Cys	Val	Thr	Thr	Gln	Trp	Phe	Phe	Asp	Ser	Ile	Glu
260				265				270							
Lys	Gly	Phe	Cys	Gln	Asp	Glu	Ser	Ile	Tyr	Lys	Thr	Glu	Pro	Arg	Pro
275				280				285							
Glu	Ala	Lys	Thr	Met	Pro	Asn	Ser	Ser	Thr	Pro	Thr	Ser	Gln	Ile	Asn
290				295				300							
Thr	Ile	Asp	Ser	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Val	Ser	Asn	Ile	Ser	Asn	Ile
305				310				315				320			
Asn	Ala	Ser	Cys	Val	Ser	Glu	Ser	Ile	Cys	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Lys
325				330				335							
Leu	Glu	Pro	Thr	Leu	Glu	Asn	Leu	Glu	Asn	Leu	Asp	Val	Ser	Ala	Phe
340				345				350							
Gln	Ala	Pro	Glu	Asp	Leu	Leu	Asp	Gly	Cys	Arg	Ile	Tyr	Leu	Cys	Gly
355				360				365							
Phe	Ser	Gly	Arg	Lys	Leu	Asp	Lys	Leu	Arg	Arg	Leu	Ile	Asn	Ser	Gly
370				375				380							
Gly	Gly	Val	Arg	Phe	Asn	Gln	Leu	Asn	Glu	Asp	Val	Thr	His	Val	Ile
385				390				395				400			
Val	Gly	Asp	Tyr	Asp	Asp	Glu	Leu	Lys	Gln	Phe	Trp	Asn	Lys	Ser	Ala
405				410				415							
His	Arg	Pro	His	Val	Val	Gly	Ala	Lys	Trp	Leu	Leu	Glu	Cys	Phe	Ser
420				425				430							
Lys	Gly	Tyr	Met	Leu	Ser	Glu	Glu	Pro	Tyr	Ile	His	Ala	Asn	Tyr	Gln
435				440				445							
Pro	Val	Glu	Ile	Pro	Val	Ser	His	Gln	Pro	Glu	Ser	Lys	Ala	Ala	Leu
450				455				460							
Leu	Lys	Lys	Lys	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser	Lys	Lys	Asp	Phe	Ala	Pro	Ser
465				470				475				480			
Glu	Lys	His	Glu	Gln	Ala	Asp	Glu	Asp	Leu	Leu	Ser	Gln	Tyr	Glu	Asn
485				490				495							
Gly	Ser	Ser	Thr	Val	Val	Glu	Ala	Lys	Thr	Ser	Glu	Ala	Arg	Pro	Phe
500				505				510							
Asn	Asp	Ser	Thr	His	Ala	Glu	Pro	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	His	Ile	Ser

515	520	525
Leu Gln Glu Glu Asn Gln Ser Ser Val Ser His Cys Val Pro Asp Val		
530	535	540
Ser Thr Ile Thr Glu Glu Gly Leu Phe Ser Gln Lys Ser Phe Leu Val		
545	550	555
Leu Gly Phe Ser Asn Glu Asn Glu Ser Asn Ile Ala Asn Ile Ile Lys		
565	570	575
Glu Asn Ala Gly Lys Ile Met Ser Leu Leu Ser Arg Thr Val Ala Asp		
580	585	590
Tyr Ala Val Val Pro Leu Leu Gly Cys Glu Val Glu Ala Thr Val Gly		
595	600	605
Glu Val Val Thr Asn Thr Trp Leu Val Thr Cys Ile Asp Tyr Gln Thr		
610	615	620
Leu Phe Asp Pro Lys Ser Asn Pro Leu Phe Thr Pro Val Pro Val Met		
625	630	635
Thr Gly Met Thr Pro Leu Glu Asp Cys Val Ile Ser Phe Ser Gln Cys		
645	650	655
Ala Gly Ala Glu Lys Glu Ser Leu Thr Phe Leu Ala Asn Leu Leu Gly		
660	665	670
Ala Ser Val Gln Glu Tyr Phe Val Arg Lys Ser Asn Ala Lys Lys Gly		
675	680	685
Met Phe Ala Ser Thr His Leu Ile Leu Lys Glu Arg Gly Gly Ser Lys		
690	695	700
Tyr Glu Ala Ala Lys Lys Trp Asn Leu Pro Ala Val Thr Ile Ala Trp		
705	710	715
Leu Leu Glu Thr Ala Arg Thr Gly Lys Arg Ala Asp Glu Ser His Phe		
725	730	735
Leu Ile Glu Asn Ser Thr Lys Glu Glu Arg Ser Leu Glu Thr Glu Ile		
740	745	750
Thr Asn Gly Ile Asn Leu Asn Ser Asp Thr Ala Glu His Pro Gly Thr		
755	760	765
Arg Leu Gln Thr His Arg Lys Thr Val Val Thr Pro Leu Asp Met Asn		
770	775	780
Arg Phe Gln Ser Lys Ala Phe Arg Ala Val Val Ser Gln His Ala Arg		
785	790	795
Gln Val Ala Ala Ser Pro Ala Val Gly Gln Pro Leu Gln Lys Glu Pro		
805	810	815
Ser Leu His Leu Asp Thr Pro Ser Lys Phe Leu Ser Lys Asp Lys Leu		
820	825	830
Phe Lys Pro Ser Phe Asp Val Lys Asp Ala Leu Ala Ala Leu Glu Thr		
835	840	845
Pro Gly Arg Pro Ser Gln Gln Lys Arg Lys Pro Ser Thr Pro Leu Ser		
850	855	860
Glu Val Ile Val Lys Asn Leu Gln Leu Ala Leu Ala Asn Ser Ser Arg		
865	870	875
Asn Ala Val Ala Leu Ser Ala Ser Pro Gln Leu Lys Glu Ala Gln Ser		
885	890	895
Glu Lys Glu Glu Ala Pro Lys Pro Leu His Lys Val Val Val Cys Val		
900	905	910
Ser Lys Lys Leu Ser Lys Lys Gln Ser Glu Leu Asn Gly Ile Ala Ala		

	915						920				925						
Ser	Leu	Gly	Ala	Asp	Tyr	Arg	Trp	Ser	Phe	Asp	Glu	Thr	Val	Thr	His		
	930						935				940						
Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Arg	Pro	Asn	Asp	Thr	Asn	Arg	Glu	Tyr	Lys	Ser		
945					950					955					960		
Val	Lys	Glu	Arg	Gly	Val	His	Ile	Val	Ser	Glu	His	Trp	Leu	Leu	Asp		
				965					970					975			
Cys	Ala	Gln	Glu	Cys	Lys	His	Leu	Pro	Glu	Ser	Leu	Tyr	Pro	His	Thr		
			980					985					990				
Tyr	Asn	Pro	Lys	Met	Ser	Leu	Asp	Ile	Ser	Ala	Val	Gln	Asp	Gly	Arg		
		995					1000					1005					
Leu	Cys	Asn	Ser	Arg	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Ser	Ser	Thr	Lys	Asp	Asp		
	1010						1015				1020						
Glu	Pro	Asp	Pro	Leu	Ile	Leu	Glu	Glu	Asn	Asp	Val	Asp	Asn	Met	Ala		
1025					1030					1035					1040		
Thr	Asn	Asn	Lys	Glu	Ser	Ala	Pro	Ser	Asn	Gly	Ser	Gly	Lys	Asn	Asp		
				1045					1050					1055			
Ser	Lys	Gly	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Leu	Glu	Met	Arg	Glu	Asn	Phe	Gln		
		1060						1065					1070				
Lys	Gln	Leu	Gln	Glu	Ile	Met	Ser	Ala	Thr	Ser	Ile	Val	Lys	Pro	Gln		
	1075						1080					1085					
Gly	Gln	Arg	Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Gly	Cys	Asn	Ser	Ala	Ser	Ser		
	1090					1095				1100							
Thr	Pro	Asp	Ser	Thr	Arg	Ser	Ala	Arg	Ser	Gly	Arg	Ser	Arg	Val	Leu		
1105					1110					1115					1120		
Glu	Ala	Leu	Arg	Gln	Ser	Arg	Gln	Thr	Val	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Glu		
				1125					1130					1135			
Pro	Ser	Gln	Asn	Glu	Gln	Ile	Ile	Trp	Asp	Asp	Pro	Thr	Ala	Arg	Glu		
		1140					1145						1150				
Glu	Arg	Ala	Arg	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Gln	Trp	Pro	Ser	Cys	Pro	Thr		
	1155						1160				1165						
Gln	Tyr	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Asp	Ile	Gln	Asn	Leu	Glu	Asp	Ser	Pro		
	1170					1175				1180							
Phe	Gln	Lys	Pro	Leu	His	Asp	Ser	Glu	Ile	Ala	Lys	Gln	Ala	Val	Cys		
1185					1190					1195					1200		
Asp	Pro	Gly	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Glu	Ala	Pro	Lys	His	Pro	Ile	Ser		
			1205						1210					1215			
Glu	Glu	Leu	Glu	Thr	Pro	Ile	Lys	Asp	Ser	His	Leu	Ile	Pro	Thr	Pro		
		1220					1225						1230				
Gln	Ala	Pro	Ser	Ile	Ala	Phe	Pro	Leu	Ala	Asn	Pro	Pro	Val	Ala	Pro		
	1235						1240					1245					
His	Pro	Arg	Glu	Lys	Ile	Ile	Thr	Ile	Glu	Glu	Thr	His	Glu	Glu	Leu		
	1250					1255				1260							
Lys	Lys	Gln	Tyr	Ile	Phe	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu</							

1315	1320	1325
Leu His Arg Ser Tyr Leu Glu Ala Cys Arg Thr Ala Gly His Phe Val		
1330	1335	1340
Gln Glu Glu Asp Tyr Glu Trp Gly Ser Ser Ser Ile Leu Asp Val Leu		
1345	1350	1355
Thr Gly Ile Asn Val Gln Gln Arg Arg Leu Ala Leu Ala Ala Met Arg		
	1365	1370
Trp Arg Lys Lys Ile Gln Gln Arg Gln Glu Ser Gly Ile Val Glu Gly		175
	1380	1385
Ala Phe Ser Gly Trp Lys Val Ile Leu His Val Asp Gln Ser Arg Glu		1390
	1395	1400
Ala Gly Phe Lys Arg Leu Leu Gln Ser Gly Gly Ala Lys Val Leu Pro		1405
	1410	1415
Gly His Ser Val Pro Leu Phe Lys Glu Ala Thr His Leu Phe Ser Asp		1420
1425	1430	1435
Leu Asn Lys Leu Lys Pro Asp Asp Ser Gly Val Asn Ile Ala Glu Ala		1440
	1445	1450
Ala Ala Gln Asn Val Tyr Cys Leu Arg Thr Glu Tyr Ile Ala Asp Tyr		1455
	1460	1465
Leu Met Gln Glu Ser Pro Pro His Val Glu Asn Tyr Cys Leu Pro Glu		1470
	1475	1480
Ala Ile Ser Phe Ile Gln Asn Asn Lys Glu Leu Gly Thr Gly Leu Ser		1485
	1490	1495
Gln Lys Arg Lys Ala Pro Thr Glu Lys Asn Lys Ile Lys Arg Pro Arg		1500
1505	1510	1515
Val His		1520
	1522	

【0103】配列番号: 4

配列の長さ: 2379

配列の型: 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:

配列

CTTTCCCAAA ACTCTCTCAA AATTGCGAGC CTTGGTCATG GCCTTTATCA CCTCCCGCAG	60
AGACTGAGTC ATGCTGGTCA TCGTGGACGG TTTTCCAGCC TTTGGGCTTT GCGCAAGAAC	120
GAATTCGGA AGAGCTGGAA AGTCCAGAAG TTAGTGAAAG AAGGACACAA AGGGCGAAGA	180
GCCCGCACCC TTCTCCGCCC CTAGGAGCGC AAGAGGCCGG GAGTCAGGCG AGCTGGCAGC	240
CCCGGTGGTC CGCGATTTCG TCACTGACTT TCCTCGCACC CTTGTGACGA AGCGCGCATG	300
CGCGCTTCGC ACCCACC GCC CCGGCGGCTC CTTGCGGCG CAGCTGCACC AGTTTTCCGA	360
GAGCGGAGCG CATTTCCCCG CCGGCGGTT G ATG CGG GAG CGC CAT GAC ACA	412
GGC GCC TGC GCA GAG CCG CGC GTT GGC CTC CTG TTC CGC TTA AAG GGG	460
CGG TGC AGA GGC GGC AGG AAG ATG GAG TTG GGG AGT TGC CTG GAG GGC	508
GGG AGG GAG GCG GCG GAG GAA GAG GGC GAG CCT GAG GTG AAA AAG CGG	556
CGA CTT CTG TGT GTG GAG TTT GCC TCG GTC GCA AGC TGC GAT GCC GCA	604
GTG GCT CAG TGC TTC CTG GCC GAG AAC GAC TGG GAG ATG GAA AGG GCT	652
CTG AAC TCC TAC TTC GAG CCT CCG GTG GAG GAG AGC GCC TTG GAA CGC	700
CGA CCT GAA ACC ATC TCT GAG CCC AAG ACC TAT GTT GAC CTA ACC AAT	748
GAA GAA ACA ACT GAT TCC ACC ACT TCT AAA ATC AGC CCA TCT GAA GAT	796
ACT CAG CAA GAA AAT GGC AGC ATG TTC TCT CTC ATT ACC TGG AAT ATT	844
GAT GGA TTA GAT CTA AAC AAT CTG TCA GAG AGG GCT CGA GGG GTG TGT	892
TCC TAC TTA GCT TTG TAC AGC CCA GAT GTG ATA TTT CTA CAG GAA GTT	940
ATT CCC CCA TAT TAT AGC TAC CTA AAG AAG AGA TCA AGT AAT TAT GAG	988

```

ATT ATT ACA GGT CAT GAA GAA GGA TAT TTC ACA GCT ATA ATG TTG AAG 1036
AAA TCA AGA GTG AAA TTA AAA AGC CAA GAG ATT ATT CCT TTT CCA AGT 1084
ACC AAA ATG ATG AGA AAC CTT TTA TGT GTG CAT GTG AAT GTG TCA GGA 1132
AAT GAG CTT TGC CTT ATG ACA TCC CAT TTG GAG AGC ACC AGA GGG CAT 1180
GCT GCG GAA CGA ATG AAT CAG TTA AAA ATG GTT TTA AAG AAA ATG CAA 1228
GAG GCT CCA GAG TCA GCT ACA GTT ATA TTT GCA GGA GAT ACA AAT CTA 1276
AGG GAT CGA GAG GTT ACC AGA TGT GGT GGT TTA CCC AAC AAC ATT GTG 1324
GAT GTC TGG GAG TTT TTG GGC AAA CCT AAA CAT TGC CAG TAT ACA TGG 1372
GAT ACA CAA ATG AAC TCT AAT CTT GGA ATA ACT GCT GCT TGT AAA CTT 1420
CGT TTT GAT CGA ATA TTT TTC AGA GCA GCA GCA GAA GAG GGA CAC ATT 1468
ATT CCC CGA AGT TTG GAC CTT CTT GGA TTA GAA AAA CTG GAC TGT GGT 1516
AGA TTT CCT AGT GAT CAC TGG GGT CTT CTG TGC AAC TTA GAT ATA ATA 1564
TTG TAA AATGCTTTTC AAGTGTGGGT TTTGCCCTGA TTGTTGCAAA TACAATTTCC 1620
ACCTTCTGGA AAGGTAGGTT TGCTGTGGAG GAAATAATGT ACTAGATCAT TGTCACAGAA 1680
AAACCAACTA TGATTTATGG TTGTGTTTTTC AGAATTCAAC ATTAAGATT AATGTTTATT 1740
TAAACGAACA CATTCTGCA TTCAGGATGT GAGGCCATTT AATAAAAAGG GCACAAAGCC 1800
TGTCAGAGTT TTCAACGGTG CTTACAGCTG CCAGCTGGAT TCCAAACAGG TACCCCATTTG 1860
TCTCTGAGCT AATGTTTATA TTTTCCATT CAGGCACCGA AATAGTTAAT ATTTAAAATA 1920
AGTCTTCAAA AGAAAACATA AGAGATTATT GAGTTCTTGG GACTGGATCC TTTATTTTAT 1980
AAGTTCAGAT CATCTTAAAT GAAAATGCCA TGATTATCTG CAGTTAAGTA GATGACAGCT 2040
ATTCTACATC AGACTTGATT TTTGTCAGCT AATTACATAA TTGGTAAGCT ATAATTGAAA 2100
CCTTATGGCT TAAAATTCCT TAACCTCTTT TTGATTCATG TTTGTAGTCA TGTTGTCAAC 2160
AGAGGCAAAG TTAAGCTTGA TGATGGTTAA AATCGGTTTG ATAGCACCAT GGGACATTTT 2220
TCTAACAAAA ATAAATGCAT GAAGAGACAT AGCCTTTTAG TTTTGCTAAT TGTGAAATGG 2280
TCTCCGTTTC AATTCGAACT ACTACCAATT TTAGCCAAAC TATCGTGGTA CCCTGTAAAA 2340
AGATTGTTTT TATTTACGTA CTTCTCTGTA TCGGAAAATC AAAACGATTA ACACCTTACC 2280
AAATGCTTTA CAGGAAGTAA ATGCAAATTA CTTTAAAGTG TGCTTTAAAG AAAAATATTT 2340
TCCCCACAGG AGAAATTTAA ATAAAGAATT TTATTTGTT 2379

```

【0104】配列番号: 5

鎖の数: 二本鎖

配列の長さ: 5256

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

配列の種類:

配列

```

CGACCCAGC CACCGCCCTG CGGCCAGCGC GTCCCCGAC TCGCCGCCCG GAGACCCGA 60
GGCTCCAACG AGTTCAGAA ATG TCC AGA AAT GAC AAA GAA CCG TTT TTT GTG 112
AAG TTT TTA AAG TCT TCA GAC AAT TCC AAA TGT TTT TTT AAA GCT CTC 160
GAG TCC ATA AAA GAA TTC CAA TCA GAA GAA TAT CTT CAG ATT ATT ACA 208
GAA GAA GAG GCA TTG AAG ATA AAG GAG AAT GAT AGA TCA CTT TAT ATC 256
TGC GAC CCT TTT AGT GGC GTT GTC TTT GAT CAC CTC AAA AAG CTT GGC 304
TGC AGA ATT GTT GGT CCT CAA GTA GTC ATA TTT TGT ATG CAC CAC CAG 352
CGA TGT GTC CCA AGA GCC GAA CAT CCA GTT TAT AAT ATG GTT ATG TCT 400
GAT GTA ACC ATA TCT TGT ACA AGT CTG GAA AAA GAA AAA AGG GAA GAA 448
GTT CAT AAA TAT GTA CAA ATG ATG GGC GGA CGA GTA TAC AGA GAC CTT 496
AAT GTA TCA GTA ACT CAC CTT ATT GCA GGA GAA GTT GGT AGC AAA AAA 544
TAT TTA GTT GCT GCA AAC CTG AAG AAA CCT ATT TTG CTT CCC TCT TGG 592
ATA AAA ACA CTT TGG GAG AAG TCA CAA GAG AAA AAA ATA ACT AGA TAT 640
ACT GAT ATA AAC ATG GAA GAT TTC AAG TGT CCT ATT TTT CTT GGT TGC 688
ATA ATC TGT GTG ACT GGC TTA TGT GGC TTA GAC AGG AAA GAA GTT CAG 736
CAA CTC ACA GTT AAG CAT GGA GGT CAA TAC ATG GGA CAA TTG AAA ATG 784
AAT GAA TGT ACA CAC CTC ATT GTG CAA GAA CCA AAA GGT CAG AAG TAT 832
GAG TGT GCC AAG AGA TGG AAT GTA CAC TGT GTG ACC ACA CAG TGG TTT 880

```

TTT GAC AGT ATT GAG AAA GGT TTT TGT CAG GAT GAA TCC ATA TAC AAG	928
ACA GAA CCT AGA CCA GAA GCA AAG ACT ATG CCC AAT TCT TCA ACT CCT	976
ACC AGC CAG ATC AAC ACA ATT GAT AGT CGT ACT CTT TCA GAT GTC AGC	1024
AAT ATT TCC AAC ATA AAT GCA AGT TGC GTA AGT GAA TCA ATA TGT AAT	1072
TCA CTT AAC AGC AAA CTG GAG CCT ACA CTT GAA AAT CTA GAA AAT CTG	1120
GAT GTC AGT GCA TTT CAA GCA CCT GAA GAT TTA TTA GAT GGT TGT CGG	1168
ATA TAT CTT TGC GGT TTT AGT GGC AGA AAG CTA GAT AAA CTG AGA AGA	1216
CTT ATT AAC AGT GGA GGT GGA GTT CGT TTT AAC CAG CTA AAT GAA GAT	1264
GTA ACT CAT GTT ATT GTG GGA GAT TAT GAT GAT GAA TTG AAG CAG TTT	1312
TGG AAT AAA TCA GCC CAC AGG CCT CAT GTA GTG GGA GCA AAG TGG TTG	1360
CTA GAG TGT TTC AGT AAA GGT TAT ATG CTT TCT GAA GAA CCA TAT ATC	1408
CAT GCT AAT TAC CAG CCA GTG GAA ATT CCA GTT TCA CAT CAG CCT GAA	1456
AGT AAA GCA GCT CTT TTA AAA AAG AAG AAC AGC AGC TTC TCT AAG AAA	1504
GAC TTT GCT CCT AGT GAA AAG CAT GAG CAA GCT GAT GAA GAT CTG CTC	1552
TCT CAA TAT GAA AAT GGT AGC TCC ACA GTA GTT GAG GCT AAG ACG TCT	1600
GAA GCC AGG CCC TTT AAT GAT TCT ACT CAT GCT GAG CCC TTG AAT GAT	1648
TCT ACT CAC ATT TCT TTG CAA GAA GAA AAC CAG TCT TCT GTC AGT CAT	1696
TGT GTC CCT GAT GTT TCT ACA ATT ACT GAA GAA GGC TTA TTT AGC CAA	1744
AAG AGT TTC CTT GTT TTG GGT TTT AGT AAT GAA AAT GAA TCT AAC ATC	1792
GCA AAC ATC ATA AAA GAA AAT GCT GGG AAA ATC ATG TCC CTT CTG AGC	1840
AGA ACT GTT GCG GAT TAT GCT GTG GTT CCT CTG CTG GGG TGT GAA GTG	1888
GAA GCC ACT GTG GGA GAA GTT GTT ACA AAT ACA TGG CTG GTT ACT TGC	1936
ATA GAC TAT CAG ACT TTG TTT GAT CCA AAG TCG AAT CCT CTC TTC ACA	1984
CCA GTT CCA GTA ATG ACA GGA ATG ACT CCT TTA GAG GAT TGT GTT ATT	2032
TCA TTT AGC CAG TGT GCT GGA GCA GAA AAA GAG TCT TTA ACA TTC CTA	2080
GCA AAC CTC CTT GGA GCA AGT GTT CAA GAA TAC TTT GTT CGC AAA TCC	2128
AAT GCA AAG AAA GGC ATG TTT GCC AGT ACT CAT CTT ATA CTG AAA GAA	2176
CGT GGT GGC TCT AAA TAT GAA GCT GCA AAG AAG TGG AAT TTA CCT GCC	2224
GTT ACT ATA GCT TGG CTG TTG GAG ACT GCT AGA ACG GGA AAG AGA GCA	2272
GAC GAA AGC CAT TTT CTG ATT GAA AAT TCA ACT AAA GAA GAA CGA AGT	2320
TTG GAA ACA GAA ATA ACA AAT GGA ATC AAT CTA AAT TCA GAT ACT GCA	2368
GAG CAT CCT GGC ACA CGC CTG CAA ACT CAC AGA AAA ACC GTC GTT ACA	2416
CCT TTA GAT ATG AAC CGC TTT CAG AGT AAA GCT TTC CGT GCT GTG GTC	2464
TCA CAA CAT GCC AGA CAG GTC GCA GCC TCC CCA GCA GTA GGA CAA CCA	2512
CTT CAG AAG GAG CCC TCG TTA CAC CTG GAT ACA CCA TCA AAA TTC CTG	2560
TCC AAG GAC AAA CTC TTC AAG CCT TCC TTT GAT GTG AAG GAT GCA CTT	2608
GCA GCC TTG GAA ACT CCA GGA CGT CCC AGC CAA CAG AAA AGG AAA CCG	2656
AGT ACG CCA CTC TCA GAA GTT ATT GTC AAA AAC TTG CAA CTT GCT TTG	2704
GCA AAT AGC TCT CGA AAT GCT GTC GCT CTT TCT GCC AGC CCT CAA CTG	2752
AAA GAG GCC CAG TCA GAG AAG GAA GAA GCC CCA AAG CCA CTT CAC AAA	2800
GTA GTG GTA TGT GTT AGT AAA AAA CTC AGT AAG AAG CAG AGT GAA CTA	2848
AAT GGG ATC GCA GCC TCT CTA GGA GCA GAT TAC AGG TGG AGT TTT GAT	2896
GAA ACA GTG ACT CAT TTC ATC TAT CAA GGG CGG CCA AAT GAC ACT AAT	2944
CGG GAG TAT AAA TCT GTA AAA GAA AGA GGA GTA CAC ATT GTT TCC GAG	2992
CAC TGG CTT TTA GAT TGT GCC CAA GAG TGT AAA CAT CTT CCT GAA TCT	3040
CTT TAT CCA CAT ACT TAT AAT CCC AAA ATG AGC TTG GAT ATC AGC GCA	3088
GTG CAA GAT GGC CGG CTC TGT AAT AGT CGA CTA CTC TCA GCT GTG TCT	3136
TCA ACA AAG GAT GAT GAG CCA GAT CCT TTG ATT TTA GAA GAA AAT GAT	3184
GTA GAC AAT ATG GCC ACC AAT AAT AAA GAG TCA GCA CCA TCA AAT GGA	3232
AGT GGA AAG AAT GAC TCT AAA GGA GTT CTG ACA CAG ACC TTA GAG ATG	3280

```

AGA GAG AAC TTT CAG AAG CAG TTA CAG GAG ATA ATG TCT GCA ACA TCA 3328
ATA GTG AAA CCC CAA GGG CAG AGG ACT TCC CTT TCA AGA AGT GGT TGT 3376
AAC AGC GCA TCT TCA ACC CCT GAC AGC ACT CGC TCT GCT CGC AGT GGA 3424
CGA AGT AGA GTC CTA GAG GCA CTG AGG CAG TCT CGT CAG ACA GTA CCT 3472
GAT GTC AAC ACA GAG CCT TCC CAA AAT GAA CAG ATC ATT TGG GAT GAC 3520
CCT ACA GCA AGG GAG GAG AGA GCA AGG CTT GCC AGC AAT TTG CAG TGG 3568
CCT AGT TGT CCC ACA CAA TAC TCT GAG CTT CAG GTT GAC ATT CAA AAC 3616
TTG GAG GAT TCT CCT TTT CAA AAG CCT TTA CAT GAT TCA GAA ATT GCT 3664
AAA CAG GCT GTC TGT GAT CCT GGA AAC ATA CGT GTG ACT GAA GCT CCC 3712
AAA CAC CCA ATC TCT GAA GAA CTG GAA ACT CCC ATA AAA GAC AGC CAC 3760
CTG ATC CCT ACG CCT CAA GCC CCC AGT ATT GCC TTT CCA CTC GCC AAC 3808
CCC CCT GTG GCT CCG CAC CCT AGA GAA AAG ATT ATA ACG ATA GAG GAG 3856
ACT CAT GAA GAA TTA AAA AAA CAG TAC ATA TTT CAG TTA TCA TCT CTG 3904
AAT CCT CAA GAA CGT ATT GAC TAT TGT CAT CTG ATT GAG AAA CTA GGT 3952
GGA TTG GTG ATA GAA AAG CAG TGC TTT GAT CCC ACC TGT ACA CAC ATT 4000
GTT GTG GGA CAT CCA CTT CGA AAC GAG AAG TAT TTA GCC TCA GTG GCA 4048
GCT GGG AAG TGG GTG CTT CAT CGC TCC TAC CTT GAA GCC TGC AGG ACT 4096
GCT GGA CAC TTC GTG CAG GAA GAA GAC TAT GAA TGG GGA AGT AGT TCC 4144
ATA CTT GAT GTT TTG ACT GGA ATC AAT GTA CAG CAA CGA AGA CTA GCA 4192
CTT GCA GCA ATG AGA TGG AGA AAA AAA ATC CAG CAA AGA CAA GAA TCT 4240
GGC ATT GTT GAG GGA GCA TTT AGT GGG TGG AAG GTT ATT TTA CAT GTG 4288
GAT CAG TCT CGA GAA GCA GGC TTC AAA CGC CTT CTT CAG TCA GGA GGA 4336
GCA AAG GTG CTA CCT GGT CAT TCT GTA CCT TTA TTT AAA GAG GCC ACA 4384
CAT CTT TTT TCT GAC TTG AAT AAA CTG AAA CCA GAT GAC TCG GGA GTT 4432
AAT ATA GCA GAA GCT GCT GCC CAG AAC GTG TAC TGC TTG AGA ACA GAA 4480
TAC ATT GCT GAT TAT CTC ATG CAG GAA TCA CCT CCT CAT GTA GAA AAT 4528
TAC TGT CTA CCA GAA GCT ATT TCA TTT ATT CAG AAT AAT AAG GAA CTT 4576
GGG ACT GGA TTA TCA CAA AAG AGG AAA GCT CCT ACA GAA AAA AAT AAA 4624
ATC AAA CGA CCT AGA GTA CAC TAA TCGCATCTAC CCTTTAGTTA CCAAACATTA 4678
AATGTTTTTA AAAATTGAAA GCCTGAATGT GACTGTGATA GATTTGGGTA GTAATTTAAA 4738
GATGAGTACC TGAAGAATTC TGCTTCAGAG TATAATGATG ACCCTTCTTG AGTTTTGAAC 4798
ACCTGAAATT GTAATCACTG AAATATTAAC TGTTTCTTAA TAAAAAGTTA CCTGAAATAA 4858
CAACAAAATA CAACTCCTCA GCTAGCTTGC TGTTAAACCA CATTGAAGTC TGTTAAAAGA 4918
TATTTATTTT TCTTGTAAT ATCTGAAGCT GTAGCTTAGT GGAAATTTTA GCAAGGTAAT 4978
GGATTTTGCT TTAATGTC TGCCTTACAA ATTCATAACA ACAAGATTTG TCAGTCAGCA 5038
TTTATTCATG TTTTCCCTGA TTTTATCTT CTCACCATTT TACCTCTTTT AACAGGAGCC 5098
TGAGCACAAAG GTTTAATGAG GAAGCTGGGG CTATAAATAT GTGTGTATAT ATGTATATGT 5158
ATGTTTGTAC AAATCTCCAT GATGTTTGCC AAGTTTGAAT GCGCAAACT TGGAAATGT 5218
GACAATAAAG AATAAAAGTA GTAAC TCAAA TTAGTATT 5256

```

【0105】配列番号: 6

配列の型: アミノ酸

配列の長さ: 479

配列の種類: ペプチド

配列

```

Asn Met Ser Leu Val Ser Leu Thr Lys Glu Lys Val Glu Glu Leu Ile
  1                      5                      10                      15
Lys Gln Arg Asp Ala Lys Gly Arg Glu Val Asn Asp Leu Lys Arg Lys
                20                      25                      30
Ser Pro Ser Asp Leu Trp Lys Glu Asp Leu Ala Ala Phe Val Glu Glu
                35                      40                      45
Leu Asp Lys Val Glu Ser Gln Glu Arg Glu Asp Val Leu Ala Gly Met
                50                      55                      60

```

Ser	Gly	Lys	Ala	Ile	Lys	Gly	Lys	Val	Gly	Lys	Pro	Lys	Val	Lys	Lys
65					70					75					80
Leu	Gln	Leu	Glu	Glu	Thr	Met	Pro	Ser	Pro	Tyr	Gly	Arg	Pro	Ile	Ile
				85					90					95	
Pro	Glu	Ile	Thr	Ala	Met	Lys	Ala	Asp	Ala	Ser	Lys	Lys	Leu	Leu	Lys
			100					105					110		
Lys	Lys	Lys	Gly	Asp	Leu	Asp	Thr	Ala	Ala	Val	Lys	Val	Glu	Phe	Asp
		115					120					125			
Glu	Glu	Phe	Ser	Gly	Ala	Pro	Val	Glu	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Ala	Leu
	130					135					140				
Thr	Pro	Ser	Val	Pro	Ile	Asn	Lys	Gly	Pro	Lys	Pro	Lys	Arg	Glu	Lys
145					150					155					160
Lys	Glu	Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Lys	Thr	Pro	Thr	Ser	Ser	Gly	Lys
			165						170					175	
Pro	Ser	Ala	Lys	Lys	Val	Lys	Lys	Arg	Asn	Pro	Trp	Ser	Asp	Asp	Glu
		180						185					190		
Ser	Lys	Ser	Glu	Ser	Asp	Leu	Glu	Glu	Thr	Glu	Pro	Val	Val	Ile	Pro
	195					200					205				
Arg	Asp	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Pro	Lys	Tyr	Thr
	210					215					220				
Phe	Asp	Phe	Ser	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Ala	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
225					230					235					240
Asp	Asn	Asn	Asp	Leu	Glu	Glu	Leu	Lys	Val	Lys	Ala	Ser	Pro	Ile	Thr
			245						250					255	
Asn	Asp	Gly	Glu	Asp	Glu	Phe	Val	Pro	Ser	Asp	Gly	Leu	Asp	Lys	Asp
		260						265					270		
Glu	Tyr	Thr	Phe	Ser	Pro	Gly	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Pro	Glu	Lys	Ser
	275						280					285			
Leu	His	Asp	Lys	Lys	Ser	Gln	Asp	Phe	Gly	Asn	Leu	Phe	Ser	Phe	Pro
	290					295					300				
Ser	Tyr	Ser	Gln	Lys	Ser	Glu	Asp	Asp	Ser	Ala	Lys	Phe	Asp	Ser	Asn
305				310						315					320
Glu	Glu	Asp	Ser	Ala	Ser	Val	Phe	Ser	Pro	Ser	Phe	Gly	Leu	Lys	Gln
			325						330				335		
Thr	Asp	Lys	Val	Pro	Ser	Lys	Thr	Val	Ala	Ala	Lys	Lys	Gly	Lys	Pro
		340						345					350		
Ser	Ser	Asp	Thr	Val	Pro	Lys	Pro	Lys	Arg	Ala	Pro	Lys	Gln	Lys	Lys
		355					360					365			
Val	Val	Glu	Ala	Val	Asn	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Glu	Phe	Gly	Ile	Pro
	370					375					380				
Lys	Lys	Thr	Thr	Thr	Pro	Lys	Gly	Lys	Gly	Arg	Gly	Ala	Lys	Lys	Arg
385					390					395					400
Lys	Ala	Ser	Gly	Ser	Glu	Asn	Glu	Gly	Asp	Tyr	Asn	Pro	Gly	Arg	Lys
			405						410				415		
Thr	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Lys	Lys	Pro	Lys	Lys	Thr	Ser	Phe	Asp	Gln
		420						425					430		
Asp	Ser	Asp	Val	Asp	Ile	Phe	Pro	Ser	Asp	Phe	Pro	Thr	Glu	Pro	Pro
	435						440				445				
Ser	Leu	Pro	Arg	Thr	Gly	Arg	Ala	Arg	Lys	Glu	Val	Lys	Tyr	Phe	Ala
	450					455					460				

Glu Ser Asp Glu Glu Glu Asp Asp Val Asp Phe Ala Met Phe Asn
465 470 475 479

【0106】配列番号：7

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：130

配列の種類：ペプチド

配列

Asn Met Ser Leu Val Ser Leu Thr Lys Glu Lys Val Glu Glu Leu Ile
1 5 10 15
Lys Gln Arg Asp Ala Lys Gly Arg Glu Val Asn Asp Leu Lys Arg Lys
20 25 30
Ser Pro Ser Asp Leu Trp Lys Glu Asp Leu Ala Ala Phe Val Glu Glu
35 40 45
Leu Asp Lys Val Glu Ser Gln Glu Arg Glu Asp Val Leu Ala Gly Met
50 55 60
Ser Gly Lys Ala Ile Lys Gly Lys Val Gly Lys Pro Lys Val Lys Lys
65 70 75 80
Leu Gln Leu Glu Glu Thr Met Pro Ser Pro Tyr Gly Arg Pro Ile Ile
85 90 95
Pro Glu Ile Thr Ala Met Lys Ala Asp Ala Ser Lys Lys Leu Leu Lys
100 105 110
Lys Lys Lys Gly Asp Leu Asp Thr Ala Ala Val Lys Val Glu Phe Asp
115 120 125
Glu Glu
130

【0107】配列番号：8

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

GGATCCGGTC AAAGAAAGAT TTGATTCAAA TG 32

【0108】配列番号：9

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

GATTTGTTGA AAAATGTTTG TGCTC 25

【0109】配列番号：10

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

GCTTCAAACG CCTTCTTCAG TCAGGAGGAGC 30

【0110】配列番号：11

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

TAATATAGCA GAAGCTGCTG CCCAGAACGT G 31

【0111】配列番号：12

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

AGGTGATCAA AGACAACGCC ACTAAAAGGG 30

【0112】配列番号：13

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

配列

TTCTGAACTC GTTGGAGCCT CGGGGTCTCC 30

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトトポイソメラーゼIIβ、TopBP1およびTopBP2の構造を模式的に示す図である。

【図2】TopBP2とNocturnin、DNA末端タンパク質の相同性を示す図である。

【図3】TopBP2とβ-アクチンの組織分布を示すノーザ

ンプロットを示す図面代用写真である。

【図4】GST-TopBP2とGSTのゲル電気泳動パターンを示す図面代用写真である。

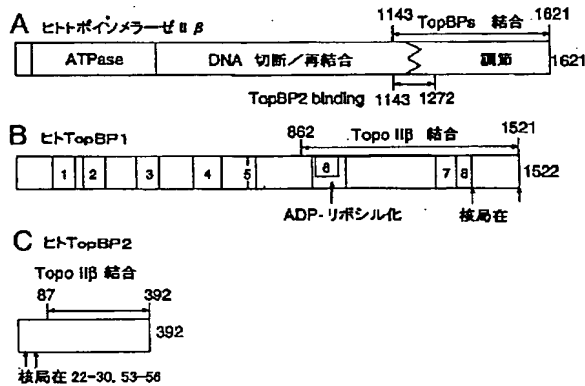
【図5】TopBP1と、Rad4、Ect2、XRCC、Rev1、およびPA

RPの各タンパク質の一部との相同性を示す図である。

【図6】TopBP1と β -アクトチンの組織分布を示すゲル電気泳動パターンを示す図面代用写真である。

【図7】GST-TopBP2とGSTのノーザンプロットを示す図

【図1】



【図2】

A ノクツーニン(Nocturnin)

43% 同一 60% 類似
 TopBP2 : 161 ERARGVCSYLALSPDVIPLQEV 183
 ER : : : Y PDV : LQEV
 Nocturnin: 131 ERKYLILEELIYDPDVLQDEV 153

28% 同一 48% 類似
 TopBP2 : 246 SCHLCLMTSHLESTRGWAERINDLQAMUQOQAPESATV 287
 :G LC:: :HL G R: Q :L : : : ATV
 Nocturnin: 233 TGROLCFAYTHLKARTGNERFRLLADGSDLLNLESITOGATV 274

40% 同一 65% 類似
 TopBP2 : 357 LGLEKLDGGRFPSPHMLLC 388
 :G :L : :PSDH: L:G
 Nocturnin: 357 IGNPLPSFNYPSPHLSLYC 376

B DNA末端タンパク質(Terminal)

32% 同一 47% 類似
 TopBP2 : 20 RLKGFCHGGRKMLGSCLEGGREAAEEGEPEVQKRLLCVEFASVASC 68
 R: GR R R : : : R:A EEEG EV RL: : : C
 Terminal:161 RMGGHGHLPNSAAAAAIDARDAGQEEGEPEVPERLMQDYKDLRRC 209

18% 同一 34% 類似
 TopBP2 : 94 PPVCSALLERFPETISEPKTYVOLTNEITDSTTSKISPEEDTQDNGSMFLITWNIDG 153
 PP EE E E E E E D: E: E: : : : D
 Terminal:378 PPEEEGEGALMEEEIEEEGAPVAFEREVDITYAELIRLEELTYSANSOFFNFVDF 437

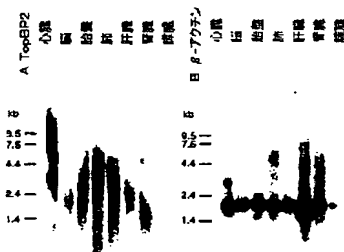
TopBP2 :154 LDUNLSEARGVCSYLALSPDVIPLQEVIPPYYSYLKRSNHYEITQHEGYFTAM 213
 : : : E : : : YL R NY : : : HE : : :
 Terminal:438 YEAMERLEALGDINESTLRFNMYFPYABHTATLNYLFORLRYNAYFARYELNLAQVY 497

TopBP2 :214 LK 215
 Terminal:498 MR 499

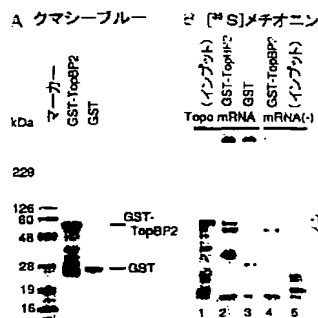
C TopBP2



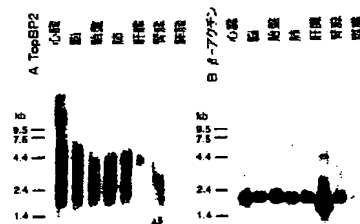
【図3】



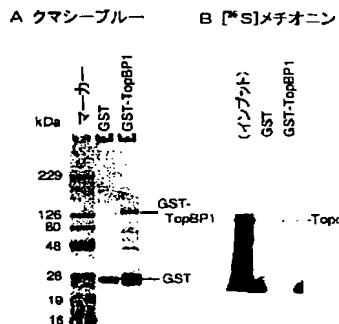
【図4】



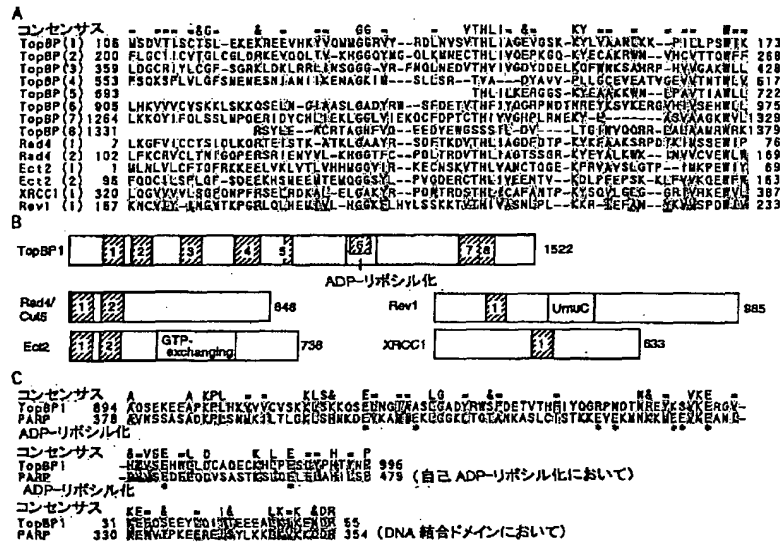
【図6】



【図7】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成9年9月25日

【手続補正1】

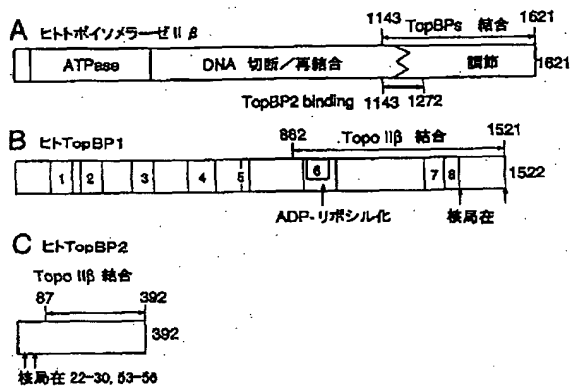
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】



【図2】

A ノクツニン(Nocturnin)

43% 同一 60% 類似

TopBP2 : 161 ERAGYCSYLALYSPOVIFLOEV 183

Nocturnin : 131 ERKYLILEETLMTYOPOMLQOEY 153

28% 同一 48% 類似

TopBP2 : 248 SGNELDLTSHLESTRGHAERINLQMLQOEAPESATY 287

Nocturnin : 233 TGRDLGFVTHLKARTGRENFLAGESSOLLNLESITOGATY 274

40% 同一 65% 類似

TopBP2 : 367 LQLEKLDGRRPSCHWGLLC 396

Nocturnin : 357 IGPRLPSFNTSDHSLVC 376

B DNA末端タンパク質(Terminal)

32% 同一 47% 類似

TopBP2 : 20 LKQKNGGGRMELGSCLEGGRAAEEGGEPVOKRFLLOVEFASVSC 58

Terminal : 161 FNGGGRHLRPNASAAAAA(DAR)AGGEEGEEVPMRMOOYKDLRC 209

18% 同一 34% 類似

TopBP2 : 94 PPVEESALERPPETISPKTYVLTNEETOSTTSKISPSDETGGSSMFLITHNIDG 153

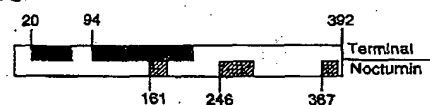
Terminal : 376 PREEDEALNEEEIEESEAFAFERVDTVAELIRLEELTVSARKSOFFNFVDF 437

TopBP2 : 154 LDNLNLSERARGVCSYLALYSPOVIFLOEVIPPYSSYLKSSSYHETHEGYETAIA 213

Terminal : 438 YEAMERLEADINESTURNNWTFVASTATTATLNTLQFLNAYFARNELNAGV 497

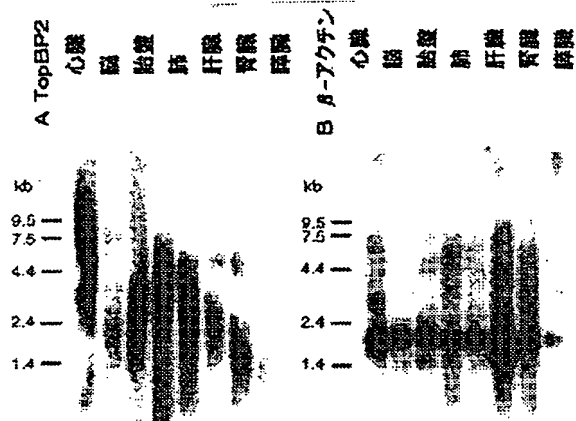
TopBP2 : 214 LK 215

Terminal : 498 NR 499

C TopBP2

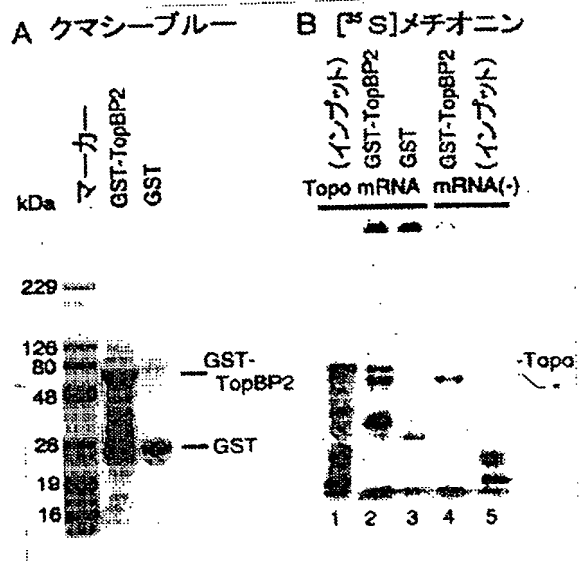
【図3】

図面代用写真

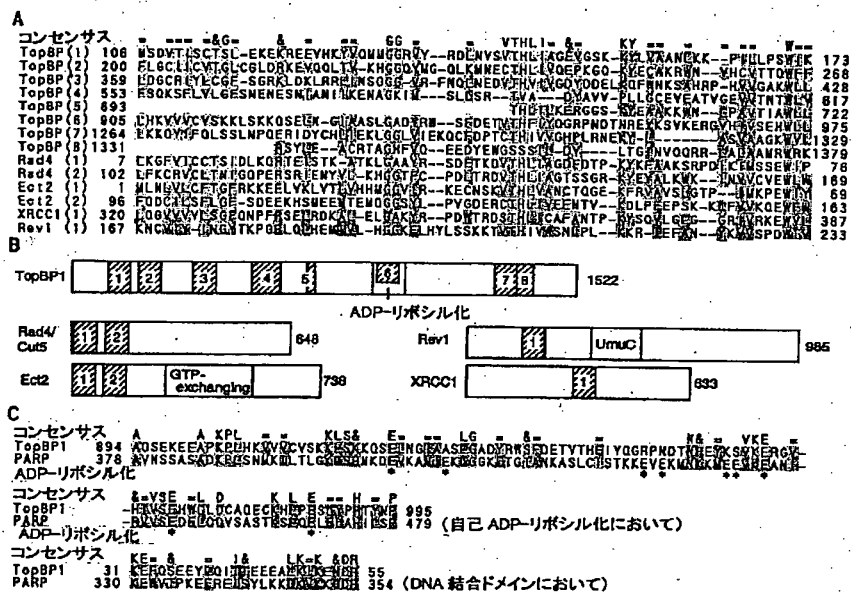


【図4】

図面代用写真

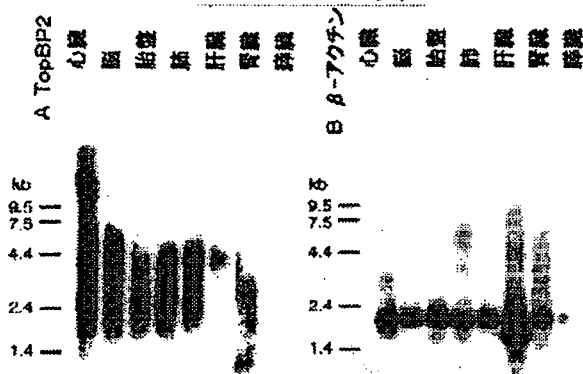


【図5】



【図6】

図面代用写真



【図7】

図面代用写真

A クマシーブルー

B [³⁵S]メチオニン